

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISE RIBEIRO DE BARROS

APLICAÇÃO DE GOMA ARÁBICA NA ESTABILIZAÇÃO E NO CONTROLE DE  
TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EM MEIO AQUOSO

CURITIBA  
2014

HELOISE RIBEIRO DE BARROS

APLICAÇÃO DE GOMA ARÁBICA NA ESTABILIZAÇÃO E NO CONTROLE DE  
TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EM MEIO AQUOSO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Química da Universidade  
Federal do Paraná, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Química,  
sub-área Físico-Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Izabel Cristina Riegel-Vidotti  
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcio Vidotti

CURITIBA

2014

Aos meus pais, Benealdo e Vera, e meus irmãos Diogo  
e Pedro, pelo amor e apoio em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Prof<sup>a</sup> Dra. Izabel Cristina Riegel-Vidotti e o Prof. Dr. Marcio Vidotti pela orientação, apoio e confiança no desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

A banca avaliadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Marcela Mohallem Oliveira, Prof<sup>a</sup> Elisa Orth e Prof. Mateus Cardoso por toda ajuda, discussões e sugestões.

A todos os amigos do grupo GPMIn pela convivência e por deixarem todos os dias mais alegres no laboratório.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, pela infra-estrutura disponibilizada para as análises de MET.

A Prof<sup>a</sup> Célia Regina Franco pela disposição e por toda a discussão dos ensaios biológicos com células tumorais realizados.

Ao Prof. Mateus Cardoso (LNLS) por disponibilizar o equipamento ZetaSizer para a determinação do potencial zeta das amostras e por toda a discussão dos resultados.

A minha família, meus pais Benealdo e Vera e meus irmãos Diogo e Pedro, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e estarem sempre comigo nas minhas conquistas.

A todos meus amigos que sempre torceram muito pelas minhas conquistas.

A CAPES pela bolsa.

Ao CNPq (projetos 477467/2010-5 e 470691/2010-7), Rede Nanoglicobiotec/CNPq (475641/10-08) pelo apoio financeiro.

À UFPR e ao PPGQ.

*“Mountains are the means, the man is the end. The goal is not to reach the top of mountains, but to improve the man.”*

Autor desconhecido

## RESUMO

O desenvolvimento de metodologias confiáveis para obter nanopartículas com controle de tamanho e distribuição estreita é de grande importância devido à dependência que há entre esses parâmetros e as propriedades físicas e químicas das nanopartículas. Além disso, um dos fatores fundamentais para a aplicação das nanopartículas está relacionado com a sua estabilidade em solução, sendo necessário o uso de agentes estabilizantes que garantam a estabilidade das partículas durante a síntese bem como a estabilidade após a síntese, em diferentes meios. Portanto, é de grande interesse o estudo das interações entre a superfície das nanopartículas e as moléculas estabilizantes. Nesse trabalho, nanopartículas de ouro (AuNPs) foram estabilizadas por goma arábica (GA) por um método simples e rápido e em condições brandas de síntese. A concentração de GA e a temperatura de síntese, foram variadas a fim de determinar a melhor condição de obtenção das AuNPs-GA. Foram obtidas nanopartículas muito pequenas (~5 nm) e com estreita distribuição de tamanho, em concentrações 0,1 e 1 % (m/V) de GA, em todas as temperaturas investigadas (25, 40 e 60 °C). A síntese das AuNPs-GA foi monitorada por espectroscopia no UV-Vis e as propriedades da banda plasmônica (BP) das AuNPs foram relacionadas com a forma e o tamanho médio das partículas, determinadas por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Além disso, foi realizado um estudo de estabilidade *in vitro* para demonstrar a origem da estabilidade superior das AuNPs-GA em relação às AuNPs sintetizadas na ausência da GA, em fluidos de simulação de pH fisiológico gástrico (pH = 1,2) e intestinal (pH = 6,8). Por técnicas de espectroscopia no UV-Vis, imagens de MET e medidas de potencial zeta foi confirmado a elevada estabilidade das AuNPs-GA em ambos os fluídos. Por outro lado, as AuNPs sintetizadas na ausência de GA perdem suas características de nanopartículas já no início do teste *in vitro*. A estabilidade das AuNPs-GA foi discutida em relação as interações estéricas e eletrostáticas proporcionadas pela GA adsorvida na superfície das nanopartículas de ouro, concluindo-se que o principal mecanismo de estabilização ocorre via repulsões estéricas. Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem para o uso das AuNPs-GA em uma variedade de aplicações biológicas por obter nanopartículas muito pequenas e com elevada estabilidade.

Palavras-chave: nanopartículas de ouro; goma arábica; estabilidade *in vitro*.

## ABSTRACT

The development of reliable methodologies to obtain nanoparticles with controlled size and narrow distribution is of great importance due the strong dependence of these parameters on their chemical and physical properties. Besides, one of the key factors to safely employ nanoparticles is related to their stability in solution. Thus, it is useful to use stabilizing agents that insure the stabilization of the particles either during the synthesis or after the synthesis, in different environments. Therefore, the study of the interactions between the nanoparticles surface and the stabilizing molecules has a great interest. In this work, gold nanoparticles (AuNPs) were stabilized by gum arabic (GA) using a simple and quick method, under mild synthesis condition. GA concentration and synthesis temperature were varied in order to determine the ideal condition to obtain AuNPs-GA. The obtained nanoparticles are very small (~ 5 nm) with narrow size distribution, in GA concentrations of 0,1 e 1 % (m/v), in all investigated temperatures (25, 40 and 60 °C). The AuNPs-GA synthesis was monitored by UV-Vis spectroscopy and the plasmon band (BP) properties of AuNPs were related to the shape and average size of the particles, obtained by transmission electronic microscopic (TEM) images. Furthermore, *in vitro* stability studies were performed to demonstrated the origin of AuNPs-GA superior stability when compared to the AuNPs synthesized in the absence of GA, in gastric (pH = 1.2) and intestinal (pH = 6.8) physiological simulated pH. By UV-Vis spectroscopy, TEM images and zeta potential measurements, the high stability of AuNPs-GA in both fluids was demonstrated. On the other hand, AuNPs synthesized in the absence of GA lose their nanoparticles characteristics at the beginning of the *in vitro* test. The AuNPs-GA stability was discussed in terms of the electrostatic and steric interactions promoted by the adsorbed GA molecules onto the gold surface. It was concluded that the main mechanism of stabilization occurs via steric repulsions. The results presented herein contribute for the safe use of AuNPs-GA in a variety of biological applications since very small and highly stable nanoparticles were obtained.

Key-words: gold nanoparticles, gum arabic, *in vitro* stability.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Modelo estrutural proposto para a fração polissacarídica da goma de acácia: A = arabinose;  $R_1$  = raminose – ácido glucurônico;  $R_2$  = galactose – 3 - arabinose;  $R_3$  = arabinose – 3 -arabinose-3-arabinose.....14

FIGURA 2. Espectro de absorção de AuNPs esféricas com diâmetros de 22, 48 e 99 nm onde a larga banda de absorção corresponde a banda plasmônica (BP). O máximo da BP das diferentes partículas foi normalizado para efeito comparativo.....17

FIGURA 3. Ilustração esquemática demonstrando a anatomia e fisiologia diferentes de tecidos tumorais e saudáveis relacionados ao efeito de permeação e retenção (EPR) das nanopartículas. (A) representa as AuNPs presentes na circulação sanguínea as quais apresentam dificuldades em penetrar no tecido saudável (B) e grande facilidade em serem retidas pelo tecido tumoral (C).....19

FIGURA 4. Representação esquemática da formação da dupla camada elétrica. A carga superficial foi assumida como sendo positiva.....21

FIGURA 5. Imagem ilustrativa das AuNPs estabilizadas por (A) GA: (1) 0,1% (m/v) 25°C, (2) 1% (m/v) 25°C, (3) 0,1% (m/v) 40°C, (4) 1% (m/v) 40°C, (5) 0,1% (m/v) 60°C e (6) 1% (m/v) 60°C. (C) AuNPs sintetizadas na ausência de GA.....27

FIGURA 6. Acompanhamento do perfil de absorção UV-Vis da (A) solução de  $AuCl_4^-$  ( $\lambda = 315$  nm) em função das sucessivas adições de GA e (B) da solução de GA ( $\lambda = 280$  nm) em função das sucessivas adições de  $NaBH_4$ . O *inset* na figura (B) mostra em detalhe a região de absorção da GA.....28

FIGURA 7. Acompanhamento do perfil de absorção UV-Vis na síntese das AuNPs na presença de (A) GA 0,1% (m/v) e (B) na ausência de agente estabilizante em função das adições sucessivas de  $NaBH_4$ .....29

FIGURA 8. Perfil de absorção da BP ao final da síntese das AuNPs na presença de GA 0,1% (m/v) e na ausência de agente estabilizante. O máximo das BPs foi normalizado para efeito comparativo.....30

FIGURA 9. Ilustração esquemática da formação das AuNPs estabilizadas pela GA no decorrer da síntese acarretando a diminuição da relação concentração GA/número de partículas.....30



FIGURA 10. Imagens de MET das (A) AuNPs-GA e (B) AuNPs sintetizadas na ausência de agente estabilizante e suas respectivas distribuições de tamanho (C) e (D). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano.....31

FIGURA 11 - Acompanhamento do perfil de absorção UV-Vis na síntese das AuNPs na presença de GA 0,1 (A) e 1% (m/v) (B) em função das adições sucessivas de  $\text{NaBH}_4$ .....33

FIGURA 12 - Perfil de absorção da BP ao final da síntese das AuNPs-GA utilizando GA 0,1 e 1% (m/v). O máximo das BPs foi normalizado para efeito comparativo.....34

FIGURA 13. Imagens de MET das AuNPs-GA sintetizadas na presença de (A) GA 0,1 e (B) 1% (M/V) e suas respectivas distribuições de tamanho (C) e (D). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano.....34

FIGURA 14 - Perfil de absorção da BP ao final das sínteses das AuNPs-GA utilizando GA 0,1% (m/v) sintetizadas à 25, 40 e 60 °C. O máximo das BPs foi normalizado para efeito comparativo.....35

FIGURA 15 – Imagens de MET das AuNPs-GA estabilizadas com GA 0,1% (m/v) sintetizadas a (A) 25, (B) 40 e (C) 60 °C e as suas respectivas distribuições de tamanho (D), (E) e (F). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano.....36

FIGURA 16 - Voltametria cíclica em solução das AuNPs-GA sintetizadas na presença de GA 0,1 e 1% (m/v). O branco foi feito na ausência de  $\text{AuCl}_4^-$ .....38

FIGURA 17. Curvas de potencial Zeta e os correspondentes ajustes Gaussianos das (A) AuNPs-GA, AuNPs e (B) GA.....39

FIGURA 18 – Espectro de absorção das AuNPs-GA (A, B, C) e AuNPs (D, E, F) mantidas à 37 °C durante 7 dias nos respectivos pHs: 5,5, 6,8 e 1,2. As setas indicam a orientação das BPs durante os dias acompanhados. O máximo das BPs foi normalizado para efeito comparativo.....41

FIGURA 19 – Imagens de MET das AuNPs sintetizadas na ausência de GA dispersas em fluido de pH intestinal (pH= 6,8) no início (A) e no final (B) do teste *in vitro* durante 7 dias, à 37 °C, e suas respectivas distribuições de tamanho (C) e (D). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano.....42

FIGURA 20 - Imagens de MET das AuNPs-GA dispersas em fluido de pH intestinal (pH= 6,8) (A e B) e gástrico (pH= 1,2) (C e D) no início (A e C) e no final (B e D) do teste *in vitro* durante 7 dias, à 37 °C, e suas respectivas distribuições de tamanho (E), (F), (G) e (H). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano.....43

FIGURA 21. Valores de potencial zeta das AuNPs-GA sintetizadas (pH~5) e dispersas em fluido de simulação de pH intestinal (pH = 6,8) e gástrico (pH = 1,2) medidos no início, no terceiro e no sétimo dia do teste de estabilidade *in vitro*.....44

FIGURA 22. Ilustração esquemática das camadas de potencial dos íons ao redor de um colóide em função da distância em água pura e em solução salina.....45

FIGURA 23. Ilustração esquemática da estabilização estérica das AuNPs proveniente da GA mesmo em baixos valores de pH onde o potencial zeta atinge valores próximos de zero.....46

FIGURA 24. Ensaio de viabilidade celular utilizando os métodos de Vermelho Neutro e MTT em células B16F10 expostas a 100 µL de GA e AuNP-GA por um período de tratamento de 48 horas.....48

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição monossacarídica e teor protéico da goma arábica.....23

TABELA 2. Amostras de AuNPs sintetizadas na presença e na ausência de GA em diferentes condições reacionais.....27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – arabinogalactana

AGP – arabinogalactana-proteína

AuNPs – nanopartículas de ouro

AuNPs-GA – nanopartículas de ouro estabilizadas por goma arábica

BP – banda plasmônica

DMEN – *Dulbeco's modified Eagles medium*

FWHM – largura a meia altura (do inglês *full width at half maximum*)

GA – goma arábica

GP – glicoproteína

$\lambda$  – comprimento de onda

$\lambda_{\text{max}}$  – comprimento de onda onde há absorção máxima

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MTT – *thiozoly blue tetrazolium bromide*

m/v – relação entre massa e volume

SFB – soro fetal bovino

$\sigma$  – desvio padrão

UV-Vis – região espectroscopia no ultravioleta e visível

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 GOMA ARÁBICA	13
1.2 NANOCÊNCIA E NANOTECNOLOGIA	15
1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO	16
1.4 ESTABILIZAÇÃO DE COLOIDES	20
<b>2. OBJETIVOS</b>	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	23
3.1 GOMA ARÁBICA	23
3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	23
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	24
3.3.1 ESPECTROCOPIA UV-VIS	24
3.3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	24
3.3.3 VOLTAMETRIA CÍCLICA EM SOLUÇÃO	24
3.4 TESTE DE ESTABILIDADE <i>IN VITRO</i>	24
3.5 ENSAIO BIOLÓGICO	25
3.5.1 CULTIVO CELULAR E TRATAMENTO	25
3.5.2 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	27
4.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	27
4.2 EFEITO DA TEMPERATURA NA SÍNTESE DAS AuNPs-GA	35
4.3 ESTUDO ELETROQUÍMICO DAS AuNPs-GA	37
4.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE <i>IN VITRO</i> DAS AuNPs-GA	38
4.5 ENSAIO BIOLÓGICO	47
4.6 DISCUSSÃO GERAL	48
<b>5. CONCLUSÕES</b>	50
<b>REFERÊNCIAS</b>	51
<b>ANEXOS</b>	58

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 GOMA ARÁBICA

A goma arábica (GA), também conhecida como goma de acácia, é obtida como uma substância exsudada das espécies de acácia quando estas estão sujeitas a algum tipo de estresse, como lesões físicas ou ataque microbiano (GLICKSMAN *et al*, 1973). A quantidade de goma produzida pela árvore depende da característica genética do material e da influência de fatores ambientais, tais como a temperatura e a incidência de chuva (ZEILJEMAKER, 1968).

Essas plantas crescem naturalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo os países africanos os maiores produtores das espécies *Acacia senegal* e *Acacia seyal*, as quais possuem elevado valor comercial. Já no Brasil, predomina a espécie *Acácia mearnsii*, conhecida popularmente como acácia-negra e encontrada principalmente no estado do Rio Grande do Sul. A acácia-negra apresenta interesse comercial visando a extração de taninos da casca do tronco da árvore. A sua madeira é utilizada na fabricação de papel e celulose, chapas de aglomerados, carvão e lenha, proporcionando o aproveitamento total dessa planta na indústria madeireira (WILLIAMS e PHILLIPS, 2000; ISLAM *et al*, 1997). Entretanto a goma exsudada da *Acácia mearnsii* não apresenta valor comercial agregado.

A GA é um polissacarídeo natural altamente ramificado e de estrutura complexa. Os três principais constituintes da GA foram isolados utilizando técnicas de cromatografia de exclusão de tamanho e afinidade hidrofóbica, obtendo como resultado arabinogalactana (AG), arabinogalactana proteica (AGP) e glicoproteína (GP). Entre eles, a AG é o componente mais importante, representando cerca de 90% do peso total da goma (RANDALL *et al*, 1989) e as AGPs tem indicado ser as responsáveis pelas propriedades de emulsificação e estabilizantes da GA (AL-ASSAFA *et al*, 2007; RANDALL *et al*, 1988; GREIN *et al*, 2013; DICKINSON, 2003).

Por ser o constituinte majoritário em sua composição, a GA é classificada como arabinogalactana. Sua estrutura é formada por uma complexa mistura de polissacarídeos e glicoproteínas, contendo unidades monossacarídeas de arabinose, galactose, ramnose e ácido glucurônico que estão ligadas às proteínas. Os principais aminoácidos das GAs comerciais são hidroxiprolina e serina, sendo que estes são compostos principalmente por grupos aminos, hidroxilas e carboxilatos. (VERBEKEN *et al*, 2003; OSMAN *et al*, 1993; GILS *et al*, 2010). A presença de diferentes grupos funcionais na estrutura da GA influencia na sua atividade interfacial. A fração polissacarídea (AG) tem caráter hidrofílico enquanto que o caráter hidrofóbico advém das proteínas, proporcionando à GA

característica anfifílica. A GA adsorve na interface entre o óleo e a água, reduzindo a tensão interfacial do sistema, onde a porção hidrofóbica adsorve fortemente a superfície de gotículas de óleo enquanto as ramificações hidrofílicas atenuam a agregação das gotículas e a coalescência por forças eletrostáticas repulsivas (DICKINSON, 2003). Um modelo para a estrutura da fração polissacarídica da GA de *Acácia senegal* está representada na FIGURA 1.

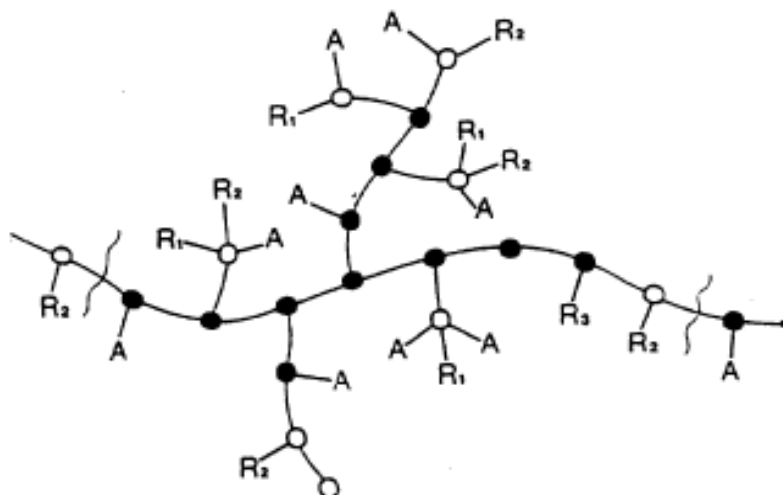


FIGURA 1. Modelo estrutural proposto para a fração polissacarídica da goma de acácia: A = arabinose; R<sub>1</sub> = ramínose – ácido glucurônico; R<sub>2</sub> = galactose – 3 - arabinose; R<sub>3</sub> = arabinose – 3 - arabinose-3-arabinose

Fonte: PHILIPS e WILLIAMS (2000)

Devido à atividade interfacial, a qual está relacionada ao teor de AGP e ao elevado grau de ramificação em sua estrutura, a GA é muito utilizada como emulsificante e estabilizante em indústrias, principalmente, alimentícias e farmacêuticas por apresentar baixa toxicidade e propriedades biocompatíveis (KATTUMURI *et al*, 2007; IDRIS *et al*, 1998; AL-ASSAFA *et al*, 2007; ISLAM *et al*, 1997; WANG *et al*, 2011). Além disso, a GA apresenta grupos hidroxilas, carboxilatos e outras funcionalidades ao longo da cadeia molecular. Com isso, a GA vem sendo muito utilizada em um novo campo de aplicação como estabilizante de nanomateriais, onde a variedade de grupos funcionais em sua cadeia associado à sua estrutura complexa são fatores essenciais para o excelente desempenho da GA como agente estabilizante de nanopartículas (KATTUMURI *et al*, 2007; IDRIS *et al*, 1998; DEVI *et al*, 2010). Os grupos funcionais presentes na GA apresentam interações com as nanopartículas metálicas, passivando a superfície do material, prevenindo a agregação e controlando o crescimento das partículas (KATTUMURI *et al*, 2007).

## 1.2 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

Ciência em nanoescala e tecnologia são áreas inerentemente multidisciplinares, relacionando os conhecimentos sobre as propriedades dos nanomateriais com o objetivo de produzir, controlar e estudar nanoestruturas e nanodispositivos. Esta abordagem possibilita a fabricação e desenvolvimento de novos materiais inteligentes para aplicação em diversas áreas (GRZELCZAK *et al*, 2008; MEDINA-RAMIREZ *et al*, 2009).

A compreensão da nanociência tem atraído o interesse de vários pesquisadores em todo o mundo devido às propriedades físicas e químicas singulares exibidas pelos nanomateriais que são significativamente diferentes, qualitativamente e quantitativamente, dos materiais em seu estado *bulk* (CAO, 2004; EUTIS e EL-SAYED, 2006; ORENDORFF *et al*, 2005). As propriedades apresentadas pelos nanomateriais são dependentes do tamanho, morfologia e estrutura das partículas (ORENDORFF *et al*, 2005; DEVI *et al*, 2010). Essas novas propriedades ocorrem principalmente devido ao efeito de confinamento quântico e ao efeito de superfície (EUTIS e EL-SAYED, 2005; RODUNER, 2006).

O efeito de confinamento quântico acontece quando uma das dimensões do material é muito pequena, fazendo com que os elétrons sejam impedidos de se deslocarem pelo material sofrendo, portanto, confinamento. Com a diminuição do tamanho das nanopartículas, os elétrons ficam mais confinados na partícula, levando a um aumento da energia do sistema (RODUNER, 2006; EUTIS e EL-SAYED, 2005). O efeito de superfície está relacionado com a elevada energia que os átomos presentes na superfície das nanopartículas possuem. O número de coordenação dos átomos da superfície é incompleto por terem poucos átomos vizinhos ligados a eles, fazendo com que estes apresentem energia maior em comparação aos átomos internos da partícula. Com o aumento da razão superfície/volume, a fração de átomos na superfície será maior e, conseqüentemente, maior será a energia superficial do sistema (RODUNER, 2006; CAO, 2004).

Devido à elevada atividade superficial das nanopartículas, sua síntese é frequentemente realizada na presença de compostos (por ex. polímeros, aminoácidos), que agem no controle e distribuição de tamanho e morfologia e previnem a aglomeração entre as partículas. Além disso, as nanopartículas podem ser funcionalizadas atuando como suporte para imobilização de biomoléculas com propriedades químicas específicas. Essa característica é muito explorada para aplicação biomédica em processos de controle liberado de fármacos, na encapsulação de materiais e no diagnóstico e tratamento de doenças (MEDINA-RAMIREZ *et al*, 2009).



A nanotecnologia tem a capacidade de promover mudanças com considerável melhora no modo atual de diagnóstico e tratamento de doenças devido as nanopartículas possuírem capacidade extraordinária na detecção e tratamento de doenças em nível celular e molecular, inclusive em células tumorais, tendo em destaque as nanopartículas de ouro no diagnóstico e tratamento do câncer. Chanda *et al* (2010) mostraram que AuNPs estabilizadas por GA quando aplicadas no interior de tumores de próstata apresentam a capacidade de regredir o tamanho do tumor, controlando o crescimento deste por pelo menos 30 dias, onde após 3 semanas de estudo os tumores apresentavam 82% de volume a menos em relação ao volume daqueles na ausência das AuNPs.

### 1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Entre as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de ouro (AuNPs) merecem grande destaque pelas suas características particulares, como elevada resistência à oxidação, elevada condução térmica e elétrica e a dependência do seu tamanho com as propriedades eletrônicas, magnéticas e óticas permitindo a sua aplicação em diferentes campos (ASTRUC e DANIEL, 2004; PEREIRA *et al*, 2007). Além disso, as AuNPs tem atraído especial interesse pela facilidade de síntese e funcionalização da sua superfície, baixa toxicidade e biocompatibilidade (OFIR *et al*, 2008). Com isso, o desenvolvimento de metodologias seguras para a síntese de AuNPs com controle de tamanhos e distribuição de tamanho tem importância imprescindível para fundamentação científica e aplicação tecnológica (ORENDORFF *et al*, 2005).

Vários métodos tem sido desenvolvidos para a síntese das AuNPs (STOKES *et al*, 2008). Em geral, os métodos físicos, também chamados de técnicas *top-down*, necessitam de uma elevada demanda energética, dificultando o controle de tamanho e composição dos materiais sintetizados, onde o sistema *bulk* é fragmentado em tamanhos menores atingindo a escala nanométrica (AO *et al*, 2008; FANG *et al*, 2008). No entanto, os métodos químicos, conhecidos como técnicas *bottom-up*, são os mais utilizados para a síntese das AuNPs (SHIBATA *et al*, 2006). Por este método, onde os íons são nucleados a partir de um agente redutor para formar nanopartículas, é mais vantajoso por obter nanopartículas com baixa distribuição de tamanho, relativa simplicidade no controle da síntese e estabilidade confiável (MEDINA-RAMIREZ *et al*, 2009; SARDAR *et al*, 2009).

Porém, devido a elevada energia superficial associada às interações de van der Waals entre as partículas, há a tendência das AuNPs se agregarem (MEDINA-RAMIREZ *et al*, 2009). Para evitar essa agregação, agentes passivantes são empregados durante a síntese, estabilizando as nanopartículas eletrostaticamente e/ou estericamente, como por

exemplo, a GA (MEDINA-RAMIREZ *et al*, 2009). Relacionado ao efeito de superfície, com a diminuição do tamanho e aumento da área superficial das AuNPs, há um número maior de elétrons movendo-se na banda de condução em comparação ao seu estado *bulk*, resultando assim nas propriedades óticas e eletrônicas distintas apresentadas pelas AuNPs (SARDAN *et al*, 2009).

A oscilação coletiva dos elétrons presentes na banda de condução por meio da incidência de um campo eletromagnético acarreta na polarização da nuvem eletrônica das partículas, levando a uma absorção acentuada de energia em determinado comprimento de onda, gerando a banda plasmônica (BP) (LINK e EL-SAYED, 2000). O perfil de absorção da BP é dependente do tamanho das nanopartículas, onde as de tamanhos menores apresentam a sua BP diminuída acentuadamente devido à menor densidade eletrônica que há na sua banda de condução (WELLER, 1994; GARRATT-REED e BELL, 2003), como apresentado pela FIGURA 2.

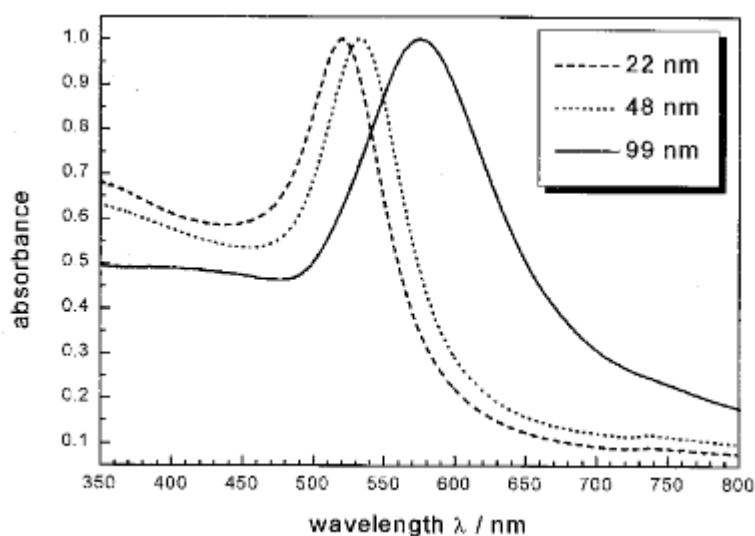


FIGURA 2. Espectro de absorção de AuNPs esféricas com diâmetros de 22, 48 e 99 nm onde a larga banda de absorção corresponde a banda plasmônica (BP). O máximo da BP das diferentes partículas foi normalizado para efeito comparativo.

Fonte: LINK e EL-SAYED (2000).

Pela FIGURA 2, é observado também o deslocamento no comprimento de onda de absorção da BP em função do tamanho das nanopartículas de ouro (LINK e EL-SAYED, 2000). Conforme o tamanho das AuNP aumenta, o campo eletromagnético deixa de polarizar a nuvem eletrônica de forma homogênea, induzindo a ressonância de outros elétrons, acarretando no deslocamento para comprimentos de ondas maiores da absorção da BP (KELLY *et al*, 2003). O perfil de absorção e deslocamento da BP é influenciado também pela forma da AuNP. Com diferentes formatos, as novas geometrias da superfície causam a mudança na densidade do campo eletromagnético incidente na

superfície, alterando a frequência de oscilação dos elétrons os quais estão relacionados com a absorção da BP (EUTIS e EL-SAYED, 2006; LIZ-MARZAN, 2004).

Além disso, a BP depende de vários outros fatores associados ao meio dispersante, constante dielétrica e pH do meio por alterarem a distribuição da densidade de cargas superficiais das nanopartículas, resultando na mudança da oscilação dos elétrons (MULVANEY, 1996; LIZ-MARZAN, 2004). A sensibilidade da BP está diretamente relacionada com as interações entre as partículas (BOISELER e ASTRUC, 2009). Moléculas ligadas a superfície das AuNPs podem influenciar no perfil de absorção da BP devido às interações com as cargas superficiais. Por outro lado, quando houver mudanças no meio dispersante, essas moléculas podem ajudar a evitar mudanças na BP por estarem recobrando e, conseqüentemente, protegendo as nanopartículas das diferentes condições do meio (EUTIS e EL-SAYED, 2006; LIZ-MARZAN, 2004).

Todos os fatores que alteram o perfil de absorção da BP provocam também mudanças expressivas na coloração das dispersões de AuNPs (LIZ-MARZAN, 2004). Segundo ASTRUC e DANIEL (2004), as AuNPs esféricas sintetizadas via redução por citrato apresentam coloração que varia de roxo a vermelho tendo uma larga absorção na região do visível em torno de 520 - 540 nm, sendo esta uma característica única de AuNPs com tamanho médio em torno de 5 nm. Com isso, o estudo das propriedades da BP fornece informações relacionadas às propriedades das AuNPs e tem sido objeto de extensivos estudos (ASTRUC e DANIEL, 2004). O monitoramento da BP tem sido realizado tanto para nanopartículas em solução quanto em filmes finos (MAYE *et al*, 2003).

A mudança nas propriedades da BP das AuNPs causadas pela interação com outras superfícies tem sido utilizada no desenvolvimento de sensores na identificação de diferentes moléculas (KATTAMURI, V., 2006; MEDINA-RAMIREZ *et al*, 2009). As AuNPs vem merecendo destaque devido ao potencial uso na detecção de células específicas, em especial de células cancerígenas, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias não-invasivas para o diagnóstico e tratamento do câncer (CHANDA *et al*, 2010; CHANDA *et al*, 2014). Com a funcionalização apropriada das AuNPs é possível detectar células cancerígenas, identificando células doentes que não são detectadas por métodos convencionais (FENT *et al*, 2009). Além disso, o tamanho pequeno das nanopartículas permite que elas passem por membranas biológicas atingindo o interior das células, onde elas podem agir como um sistema de liberação específico para células doentes enquanto poupa a saúde das células vizinhas (FENT *et al*, 2009). As AuNPs também são utilizadas na detecção de certas proteínas ou outras moléculas na superfície ou no interior das células cancerígenas as quais são capazes de interagirem com as AuNPs (GUAN *et al*, 2013; MEDINA-RAMIREZ *et al*, 2009; HERMANN *et al*, 1996).

As AuNPs permanecem por mais tempos na circulação sanguínea e se acumulam nos tecidos tumorais devido ao efeito do aumento de retenção e permeação (EPR). O efeito EPR está relacionado com a anatomia e fisiologia diferente dos tecidos tumorais em comparação aos tecidos saudáveis (NAZIR *et al*, 2014), FIGURA 3. O câncer apresenta crescimento celular irregular associado à formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes (angiogênese) levando a uma maior densidade vascular, acarretando no rápido crescimento e metástase das células tumorais. Esses vasos sanguíneos são muito porosos, com grandes espaços entre as células endoteliais, dilatados com diâmetros irregulares e não apresentam arquitetura organizada (NAZIR *et al*, 2014). O maior espaçamento entre as células endoteliais nos vasos sanguíneos do tumor faz com que o tecido tumoral retenha seletivamente as nanopartículas, proporcionando que a vasculatura do tumor atue naturalmente como um alvo de elevada afinidade para as AuNPs (KATTI *et al*, 2006; BHATTACHARYA e MUKHERJEE, 2008).

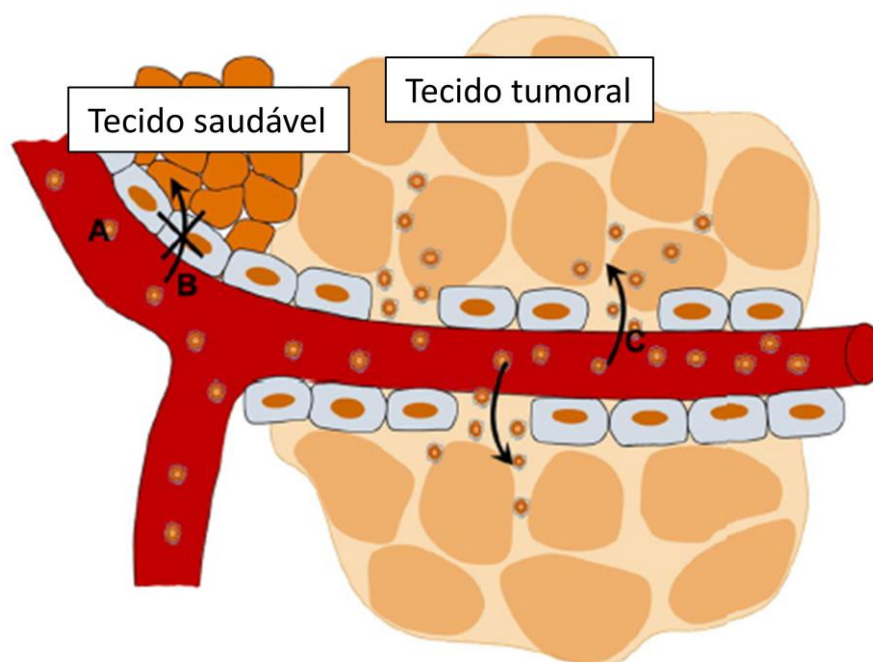


FIGURA 3. Ilustração esquemática demonstrando a anatomia e fisiologia diferentes de tecidos tumorais e saudáveis relacionados ao efeito de permeação e retenção (EPR) das nanopartículas. (A) representa as AuNPs presentes na circulação sanguínea as quais apresentam dificuldades em penetrar no tecido saudável (B) e grande facilidade em serem retidas pelo tecido tumoral (C).

FONTE: NAZIR *et al* (2014).

Segundo Kannan *et al* (2012), o desenvolvimento de novos métodos que ofereçam técnicas de combate ao câncer sem a necessidade de cirurgia será um enorme avanço na medicina. Além disso, o objetivo de tratamentos utilizando AuNPs bioconjugadas é no futuro conseguir diminuir os efeitos colaterais que há nos tratamentos convencionais, superar problemas com solubilidade e estabilidade das drogas, melhorando a eficiência e biodistribuição. Entre todas as propriedades das AuNPs, a sua

boa dispersão e estabilidade tem efeito significativo afetando diretamente no seu desempenho terapêutico final (DU *et al*, 2012).

#### 1.4 ESTABILIZAÇÃO DE COLÓIDES

A estabilidade de uma dispersão coloidal é determinada pela interação que ocorre entre as partículas dispersas nesse meio (SHAW, 1992). Estas apresentam um movimento contínuo em solução conhecido como movimento Browniano, favorecendo a colisão entre as partículas (KUCHIBHATLA *et al*, 2005). Esse fenômeno associado à elevada energia superficial dos materiais coloidais, criam interações espontâneas que ocorrem entre eles sem envolver ligações químicas, apresentando um processo de balanço entre forças intermoleculares atrativas e repulsivas a fim de promover a estabilidade do sistema (CAO, 2004; LEE, 2008). Essas interações são dependentes da distância entre as partículas, apresentando efeito significativo apenas em distâncias curtas (CAO, 2004).

Entre as interações atrativas, as forças de van der Waals, associadas ao movimento Browniano, exercem função importante na estabilização de colóides (CAO, 2004). As forças de van der Waals originam-se de interações dipolo-dipolo que atuam pela aproximação entre as partículas em determinado meio, desestabilizando o sistema (CAO, 2004; LEE, 2008).

Partículas coloidais adquirem cargas por ionização ou adsorção de íons (SHAW, 1992). A carga superficial do colóide influencia na distribuição de íons próximos através de forças eletrostáticas induzindo a formação da dupla camada elétrica (SHAW, 1992; CAO, 2004). A superfície carregada atrai os contra-íons da solução em sua direção e, com o aumento da distância, a concentração desses íons diminui formando uma camada difusa entre os íons de diferentes cargas, dando origem à dupla camada elétrica a qual está representada na FIGURA 4 (SHAW, 1992; LEE, 2008). As interações repulsivas eletrostáticas contribuem para a estabilização de colóides.

Outra importante forma de estabilizar colóides é por meio da atuação de forças de natureza estérica. Estas acontecem pela adsorção de polímeros, polieletrólitos ou biomacromoléculas na superfície das partículas coloidais (LEE, 2008). Em comparação com a estabilização eletrostática, a estabilização estérica apresenta vantagens na síntese de nanopartículas, particularmente na obtenção de uma estreita distribuição de tamanho, pois o material adsorvido na superfície das nanopartículas serve como um controlador no crescimento das espécies (CAO, 2004).

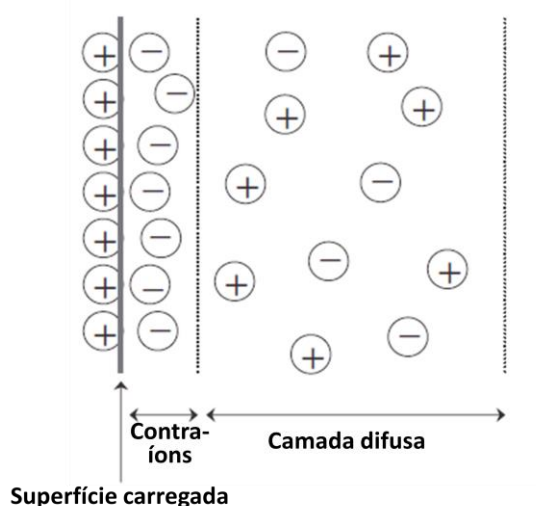


FIGURA 4. Representação esquemática da formação da dupla camada elétrica. A carga superficial foi assumida como sendo positiva.

Fonte: LEE (2008)

Em um sistema coloidal estabilizado estericamente por um polímero, qualquer alteração no meio pode afetar o modo de atuação da força estérica, tais como as interações entre polímero-polímero, polímero-solvente e polímero-colóide além das condições físico-químicas do sistema como o solvente, a temperatura e o pH do meio (LEE, 2008). Com isso, associado à estrutura e composição dos colóides e polímeros ligados a eles, estes estão suscetíveis a alterações em suas conformações podendo ser compactados ou estendidos, apresentando modificações em sua forma e tamanho inclusive na formação de agregados (DAI *et al*, 2008). Com a mudança do pH do meio e da força iônica, a carga superficial dos colóides é alterada, influenciando nas interações do sistema, portanto com o ajuste do pH do meio é possível controlar o comportamento dos colóides (JIANG e OBERDORSTER, 2009).

A forma de estabilização mais provável de ocorrer nos sistemas coloidais estabilizados por polímeros é a atuação em conjunto das forças estérica e eletrostática. Em geral, os polímeros utilizados na estabilização estérica de partículas contém grupos funcionais ionizáveis em sua estrutura promovendo também a estabilização por repulsão eletrostática. Quando duas partículas se aproximam, a repulsão eletrostática e a restrição estérica vão atuar juntas na prevenção da aglomeração de partículas em um sistema coloidal (JIANG, 2009; GOIA e MATIJEVIC, 1998).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

A proposta deste trabalho apresenta como objetivo geral a obtenção de nanopartículas de ouro coloidal empregando goma arábica como agente estabilizante a fim de controlar o tamanho e distribuição de tamanho das partículas por um método simples e rápido além de avaliar a estabilidade das nanopartículas em soluções de diferentes pHs.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de ouro na presença de goma arábica variando condições reacionais, tais como: concentração do agente estabilizante e temperatura de síntese;
- Caracterizar as propriedades das nanopartículas de ouro por técnicas de espectroscopia UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Analisar o comportamento eletroquímico e difusibilidade em solução das nanopartículas de ouro caracterizado por voltametria cíclica em solução;
- Avaliar a estabilidade da dispersão coloidal em condições fisiológicas de diferentes pHs, acompanhando seu comportamento por espectroscopia UV-Vis, imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e determinação do potencial zeta;
- Analisar as estruturas morfológicas de células tumorais expostas a diferentes concentrações de AuNPs-GA utilizando técnicas microscopias.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 GOMA ARÁBICA

A goma arábica (GA) utilizada no projeto foi obtida da empresa Sigma-Aldrich (G9752) a qual é descrita no rótulo como “goma arábica proveniente de árvore de acácia”. A goma arábica comercial (GAC) origina-se das espécies *Acacia seyal* e *A. senegal*. Antes de seu uso, a goma arábica foi solubilizada em água, dialisada contra água Milli-Q e liofilizada. O percentual de proteínas, ácidos urônicos e composição dos açúcares neutros foram determinados em trabalho anterior (GREIN *et al*, 2013) e os resultados encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1. Composição monossacarídica e teor protéico da goma arábica.

Amostra	Composição monossacarídica (%)				Açúcar total (%)	Proteína <sup>b</sup> (%)
	RHA	ARA	GAL	Ácido urônico <sup>a</sup>		
GAC	13	31	39	17	95	4

<sup>a</sup> Dosado pelo método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita, 1991.

<sup>b</sup> Dosado pelo método colorimétrico de Hartree, 1972.

Fonte: GREIN *et al*, 2013.

#### 3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

As AuNPs estabilizadas com GA (AuNPs-GA) foram obtidas por redução de  $\text{AuCl}_4^-$  em meio aquoso empregando-se 5 mL de  $\text{HAuCl}_4$   $1,75 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  em presença de 5 mL de solução de GA 0,1% (m/v) ou 1% (m/v) (soluções preparadas previamente deixadas à 4°C *overnight* para completa hidratação da goma). Em seguida, 2,4 mL do agente redutor  $\text{NaBH}_4$   $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  foi adicionado em alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  a cada 3 minutos. A temperatura da síntese foi variada em 25, 40 e 60 °C. Todas as sínteses foram acompanhadas por espectroscopia UV-vis, observando-se o desenvolvimento da BP referente às AuNPs em torno de 520 - 540 nm. Todas as amostras apresentam pH ~5 em solução aquosa. A síntese é completada em menos de uma hora. Para estudos comparativos, o mesmo procedimento foi realizado na ausência da GA ou qualquer outro agente estabilizante.



### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

#### 3.3.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

O comportamento das nanopartículas de ouro foi acompanhado por espectroscopia UV-Vis, monitorando o perfil de absorção da banda plasmônica em torno de  $\lambda = 520 - 540$  nm referente às AuNPs. As medidas foram feitas em solução aquosa utilizando espectrôfotômetro UV-Vis Agilent 8453. As análises foram feitas no Laboratório de Eletroquímica Aplicada e Polímeros - LEAP/UFPR.

#### 3.3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram feitas com uma gota da solução coloidal ( $\sim 10 \mu\text{L}$ ), depositada em grades de cobre, primeiramente revestidas com carbono, onde a amostra foi deixada para secagem sob pressão reduzida em dessecador. O tamanho e a distribuição de tamanho das nanopartículas de ouro foram determinados a partir da observação de 400 a 2000 objetos da mesma amostra, utilizando os *softwares* ImageJ e OriginPro 8, respectivamente. Foram realizadas em um microscópio JEOL 1200EX-II, operando a 80 kV. As análises foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica - CME/UFPR.

#### 3.3.3 VOLTAMETRIA CÍCLICA EM SOLUÇÃO

As análises de comportamento eletroquímico foram feitas adicionando  $600 \mu\text{L}$  da solução coloidal de AuNP-GA em 5 ml de solução eletrolítica KCl  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  em uma célula de três eletrodos utilizando óxido de estanho dopado com índio (ITO) como eletrodo de trabalho, platina como contra-eletrodo e Ag/AgCl saturado como eletrodo de referência. As voltametrias cíclicas foram obtidas em uma janela de potencial de  $-0,1 \text{ V}$  a  $+0,8 \text{ V}$  em velocidade de varredura de  $100 \text{ mVs}^{-1}$  em atmosfera inerte. As voltametrias foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT30. As análises foram feitas no Laboratório de Eletroquímica Aplicada e Polímeros - LEAP/UFPR.

### 3.4 TESTE DE ESTABILIDADE *IN VITRO*

Alíquotas de AuNPs-GA e AuNPs foram estudadas quando dispersas em fluidos de simulação de pH gástrico (pH= 1,2) e intestinal (pH= 6,8). Em 3 mL da dispersão de

AuNP-GA ou AuNP foram adicionados 1 mL do fluido simulado. As amostras foram armazenadas em um sistema à 37°C durante 7 dias, sendo o pH monitorado diariamente. Os fluidos de simulação de pH gástrico e intestinal foram preparados utilizando soluções tampão KCl/HCl e  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , respectivamente. A solução tampão de KCl/HCl foi preparada utilizando 80 mL de HCl 0,2 mol/L e 50 mL de KCl 0,2 mol/L, completando o volume para 200 mL com água. Para a preparação do tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , 6,8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi dissolvido em 900 mL de água, adicionado 77 mL de NaOH 0,2 mol/L e o volume foi completado para 1000 mL com água. Os valores das forças iônicas resultantes das soluções tampões de KCl/HCl e  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  são 0,40 mol/L e 0,25 mol/L respectivamente. A BP das amostras foi analisada em intervalos de 24 horas a fim de observar possíveis mudanças nas características das nanopartículas. Amostras correspondentes ao primeiro e ao sétimo dia foram preparadas e analisadas por imagens de MET. A carga superficial das partículas foi determinada utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS. Da mesma maneira, foram estudadas as dispersões na ausência de fluidos utilizadas como amostras controle (pH~5). As análises de potencial zeta foram feitas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS/Campinas-SP.

### 3.5 ENSAIO BIOLÓGICO

Os experimentos foram feitos segundo FRANCO et al (2009) e foram realizados no Departamento de Biologia Celular/UFPR.

#### 3.5.1 Cultivo celular e tratamento

Células de melanoma da linhagem B16F10 (BCRJ 0046) foram mantidas sob o protocolo padrão. As células foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagles Medium* – Sigma Aldrich) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino – Gibco), 10 mM de tampão HEPES (Sigma Aldrich), 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina (Gibco) e então foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida, com 5% de  $\text{CO}_2$ .

A dispersão coloidal das AuNPs-GA e da solução de GA 0,04% (m/v) foram dissolvidas no meio preparado e mantidas a 37°C antes do uso. As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço). Após 6 horas, estes foram tratados com a adição de 100 µL de AuNPs-GA e GA por 48 horas. A GA dissolvida em meio de cultura foi utilizada como grupo controle.

### 3.5.2 Ensaio de viabilidade celular

Dois diferentes métodos foram realizados para avaliar a viabilidade celular após 48 horas de tratamento. Os ensaios de Vermelho Neutro e MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) foram feitos segundo o protocolo descrito por Borenfreund e Puerner (1985) e Mosmann (1983), respectivamente. Após o tratamento com as células plaqueadas em placas de 96 poços, foram incubados com 100 µg/mL de solução de Vermelho Neutro (Sigma) à 37°C, em atmosfera úmida, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2 horas, a solução de Vermelho Neutro foi descartada e o corante internalizado foi extraído com 100 µL de solução aquosa de ácido acético : etanol (1:50) (Merck). De maneira similar, após o tratamento, 0,45 mg/mL de solução de MTT (Sigma) foi adicionada e as células foram incubadas à 37°C, em atmosfera úmida, com 5% de CO<sub>2</sub>. As placas foram invertidas após 3 horas e os cristais formados foram dissolvidos em 100 µL de DMSO (Dimetil Sulfóxido – Sigma Aldrich). A absorbância para os dois ensaios foi analisada em 550 nm e leito de microplaca (Meridian ELX800 Diagnostic Inc).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As AuNPs-GA foram sintetizadas em diferentes condições reacionais onde a temperatura de síntese e a concentração da GA foram variadas. Além disso, as AuNPs foram sintetizadas na ausência de GA ou de qualquer outro agente estabilizante, resultando em 7 amostras, como apresentando na TABELA 2. Com a formação das AuNPs, a dispersão de ouro muda sua coloração de amarelo para colorações que variam entre roxo e vermelho com diferentes intensidades dependendo das condições de síntese, FIGURA 5.

TABELA 2. Amostras de AuNPs sintetizadas na presença e na ausência de GA em diferentes condições reacionais.

Amostra	Concentração GA (% em m/v)	Temperatura de síntese (°C)
1	0,1	25
2	1	25
3	0,1	40
4	1	40
5	0,1	60
6	1	60
7	-	25

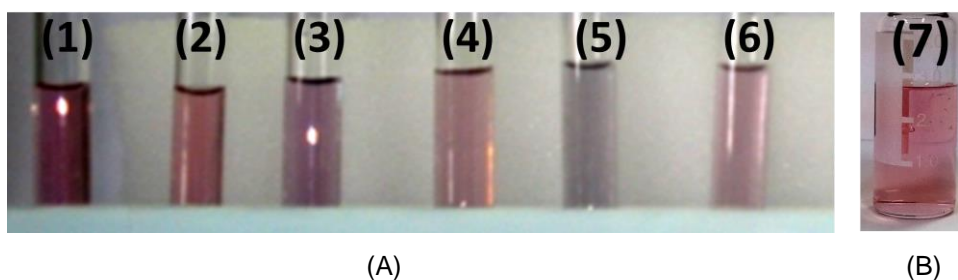


FIGURA 5. Imagem ilustrativa das AuNPs estabilizadas por (A) GA: (1) 0,1% (m/v) 25°C, (2) 1% (m/v) 25°C, (3) 0,1% (m/v) 40°C, (4) 1% (m/v) 40°C, (5) 0,1% (m/v) 60°C e (6) 1% (m/v) 60°C. (B) AuNPs sintetizadas na ausência de GA.

É importante mencionar que as AuNPs não foram formadas apenas utilizando GA para a redução de  $\text{AuCl}_4^-$ . Wu *et al* (2010) apresenta em seu trabalho AuNPs estabilizadas por GA na ausência de um agente redutor utilizando 55 °C, por 4 horas e

concentração de GA de 1% (m/m). Porém, em nossas condições de síntese (25 °C, 1 hora), foi observado que não há formação de AuNPs por esse método, evidenciado pela não ocorrência da BP característica em  $\lambda = 520 - 540$  nm, FIGURA 6 (A). Pelo espectro UV-Vis é visto que há apenas uma banda em  $\lambda = 315$  nm referente ao  $\text{AuCl}_4^-$  (ASTRUC e DANIEL, 2004). O decaimento da absorbância medido em  $\lambda = 315$  nm ocorre apenas devido à diluição da solução de  $\text{AuCl}_4^-$  pelas adições sucessivas da solução de GA. Outro experimento realizado foi para verificar se o agente redutor  $\text{NaBH}_4$  tem efeito redutor na GA. Em condições de síntese, é visto que não há modificação da banda de absorbância referente a GA ( $\lambda = 280$  nm) com as subseqüentes adições de  $\text{NaBH}_4$ , FIGURA 6 (B). Há apenas a diminuição da absorbância nessa região devido a diluição da solução de GA com as adições do agente redutor. Portanto, nas condições de síntese utilizadas, é comprovado que não há formação de nanopartículas e outras reações entre os reagentes utilizados na síntese das AuNPs-GA.

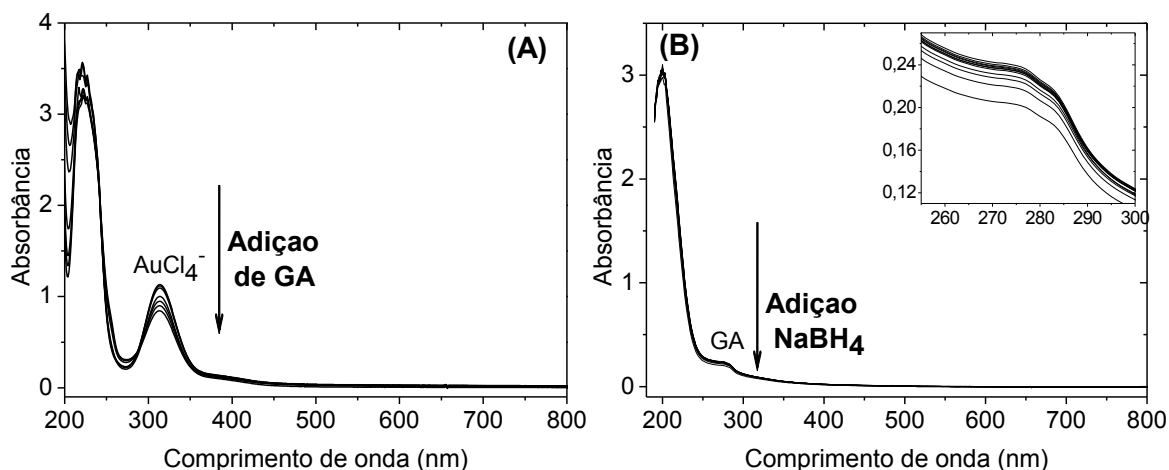


FIGURA 6. Acompanhamento do perfil de absorção UV-Vis da (A) solução de  $\text{AuCl}_4^-$  ( $\lambda = 315$  nm) em função das sucessivas adições de GA e (B) da solução de GA ( $\lambda = 280$  nm) em função das sucessivas adições de  $\text{NaBH}_4$ . O inset na figura (B) mostra em detalhe a região de absorção da GA.

Nanopartículas de ouro foram sintetizadas com sucesso em meio aquoso, tanto na presença da solução de GA 0,1 e 1% (m/v) e em todas as temperaturas, quanto na ausência do agente estabilizante. A formação das AuNPs foi evidenciada pelo aparecimento da BP no espectro UV-Vis em torno de  $\lambda = 520 - 540$  nm, correspondente a mudança de coloração amarela para colorações que variaram entre roxo-vermelho com diferentes intensidades dependendo das condições de síntese, como observado na FIGURA 7 (A) e (B).

Comparando os espectros obtidos nas sínteses empregando 0,1 % (m/v) de GA e na ausência de GA, é observado que há o deslocamento da BP para comprimentos de

ondas menores no decorrer da síntese das AuNPs-GA (FIGURA 7 (A)) enquanto durante a síntese das AuNPs na ausência de GA, a BP aumenta de intensidade no mesmo comprimento de onda, FIGURA 7 (B). É bem estabelecido que as características da BP estão relacionadas com o formato, tamanho, concentração e o meio dispersante das nanopartículas (LIZ-MARZAN, 2004; DOAK *et al*, 2010; MULVANEY, 1996). Em uma mesma condição de síntese (temperatura, solvente, presença de outros compostos, concentração), o deslocamento no comprimento de onda de absorção da BP está relacionado com o tamanho e morfologia das partículas. Partículas menores apresentam sua BP deslocada para  $\lambda$  menores e as partículas maiores apresentam BP em maiores comprimentos de onda (LINK e EL-SAYED, 2010; ASTRUC e DANIEL, 2004). Porém, nesse caso, levando em consideração o decorrer da síntese e, comparando a síntese de AuNPs na presença e na ausência de GA, esse deslocamento não pode ser explicado diretamente por esse conceito (ULLAH *et al*, 2011). Analisando os espectros UV-Vis ao final de ambas as sínteses (FIGURA 8), é observado que a BP apresenta uma absorção máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) em 519 nm e 534 nm para AuNPs-GA e AuNPs, respectivamente, indicando que nas duas condições as partículas estão na escala nanométrica além de sugerir a formação nanopartículas menores na presença de GA. Com a formação de novas partículas de ouro no decorrer da síntese, a relação concentração de GA/número de partículas diminui, FIGURA 9. Portanto, a diferença na distribuição da densidade eletrônica na superfície das partículas é alterada, deslocando a BP para comprimentos de onda menores.

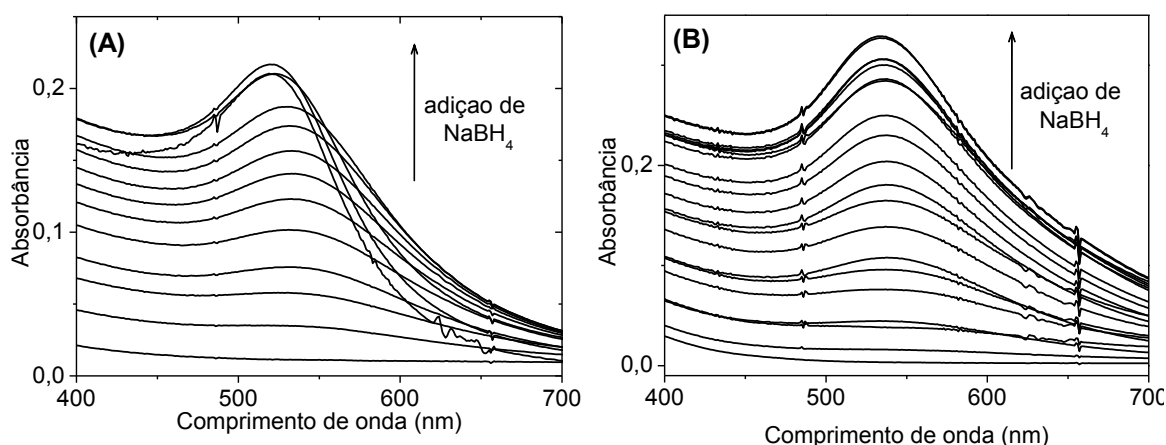


FIGURA 7. Acompanhamento do perfil de absorção UV-Vis na síntese das AuNPs na presença de (A) GA 0,1% (m/v) e (B) na ausência de agente estabilizante em função das adições sucessivas de NaBH<sub>4</sub>.

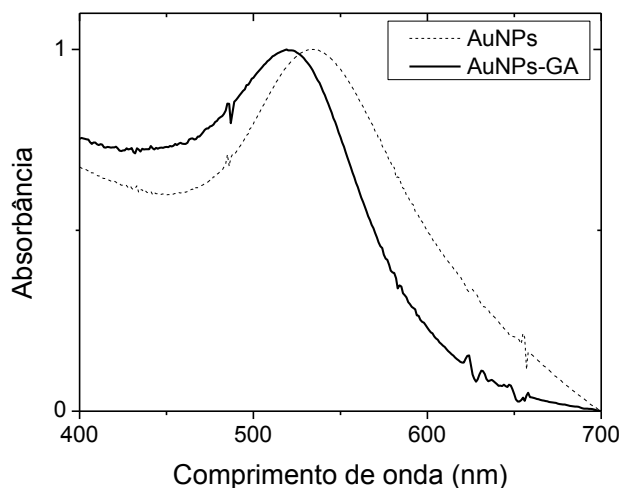


FIGURA 8. Perfil de absorção da BP ao final da síntese das AuNPs na presença de GA 0,1% (m/v) e na ausência de agente estabilizante. As BPs foram normalizadas para efeito comparativo.

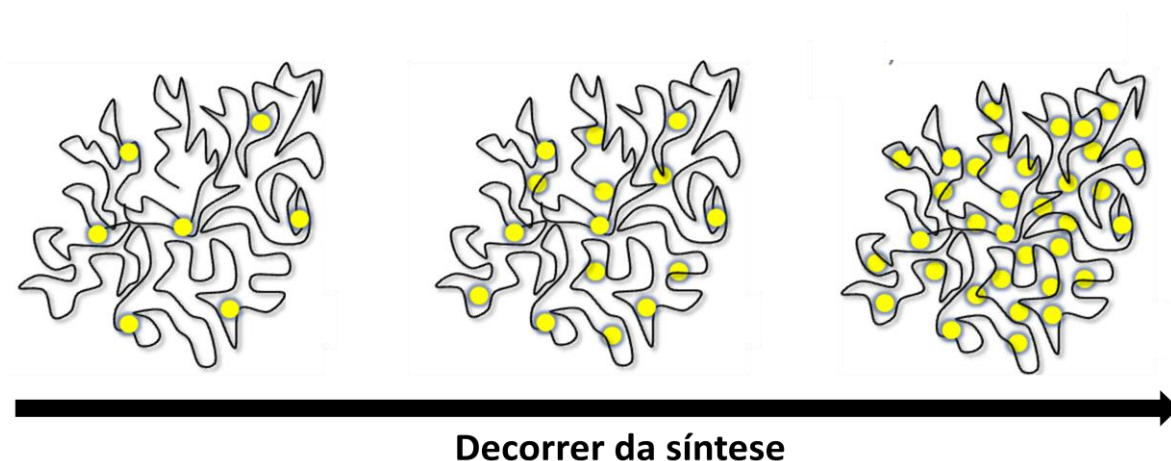


FIGURA 9. Ilustração esquemática da formação das AuNPs estabilizadas pela GA no decorrer da síntese acarretando a diminuição da relação concentração GA/número de partículas.

As imagens de MET foram obtidas para investigar o formato e o tamanho das nanopartículas. Como visto na FIGURA 10 (A), as AuNPs-GA são esféricas enquanto que AuNPs esféricas são raramente vistas na FIGURA 10 (B), onde neste caso há uma variedade nos formatos das partículas. Os tamanhos médios foram obtidos através do melhor ajuste Gaussiano da curva de distribuição de tamanho (FIGURA 10 (C) e (D), respectivamente), obtendo valores médios de  $5,4 \pm 2,1$  nm para as AuNPs-GA e  $16,2 \pm 6,1$  nm para as AuNPs. Sendo assim, as AuNPs são maiores em comparação as AuNPs-GA.

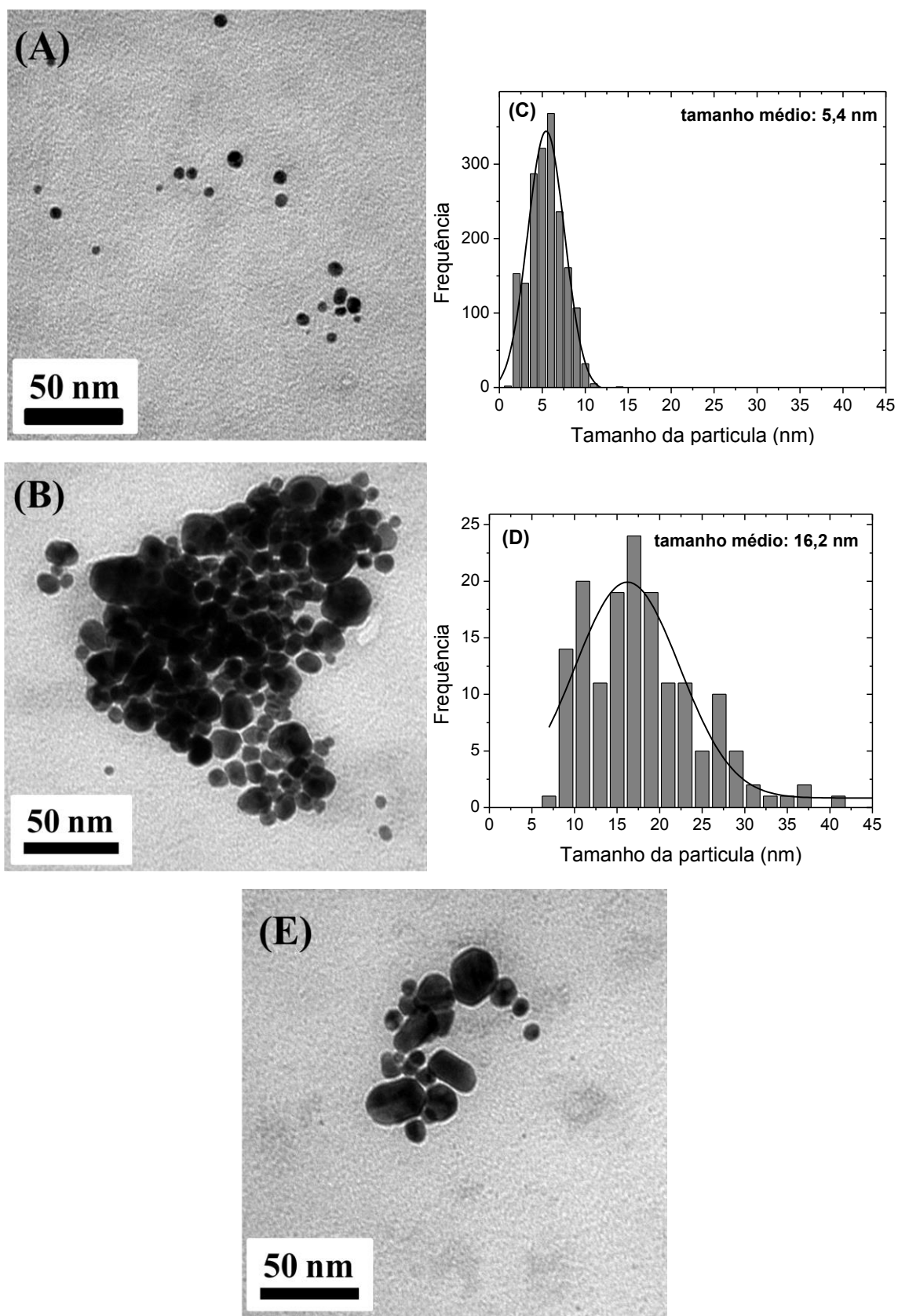


FIGURA 10. Imagens de MET das (A) AuNPs-GA e (B) das AuNPs sintetizadas na ausência de agente estabilizante e suas respectivas distribuições de tamanho (C) e (D). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano. A imagem (E) apresenta em detalhe o formato das AuNPs.



Dessa maneira, associando os resultados obtidos por espectroscopia UV-Vis e as imagens de MET, foi demonstrado que as AuNPs-GA são menores em relação às AuNPs. A formação das nanopartículas resulta de uma combinação de vários processos. A primeira etapa corresponde ao período de nucleação, dando origem a uma nova fase seguida do crescimento dos núcleos. Eventualmente, as condições experimentais influenciam nas interações entre as partículas causando a quebra ou agregação, sendo esse fator fundamental para a determinação dos agregados e da morfologia final das partículas. Partículas pequenas são muito instáveis devido à elevada energia superficial de seus átomos/moléculas. Um possível mecanismo para a formação das dispersões coloidais de ouro na presença de um agente estabilizante envolve a formação inicial de certo número de núcleos que adsorvem na cadeia molecular do estabilizante. O principal fator para a adsorção dos núcleos é devido à diminuição da energia superficial dos átomos de ouro por meio das interações favoráveis com os sítios estabilizantes, fazendo com que a distribuição da densidade eletrônica das partículas seja alterada. Após o período de nucleação, as partículas crescem pela adição de novas espécies em sua superfície. O mecanismo clássico de nucleação e crescimento proposto por LaMer (LAMER e DINEGAR, 1950) estabelece que um determinado número inicial de núcleos crescem a partir da divisão aproximadamente igual de precursores disponíveis, formando partículas em torno do mesmo tamanho e estreita distribuição de tamanho (SHIELDS *et al*, 2010).

Nesse estudo, considerando que o agente redutor é adicionado em alíquotas durante a síntese, é coerente assumir que a nucleação e crescimento das partículas ocorrem simultaneamente, o que provavelmente levaria a formação de partículas com tamanhos variados e ampla distribuição de tamanho. Isto apenas acontece no caso das AuNPs sintetizadas na ausência de agente estabilizante. Por outro lado, quando a síntese das nanopartículas de ouro é feita na presença de GA, apesar da adição do agente redutor ser em alíquotas, são sintetizadas partículas muito pequenas com estreita distribuição de tamanho. Sendo assim, a GA proporciona um meio estabilizante excelente para os novos núcleos e partículas formados, o que é ideal no controle da síntese de nanopartículas. Além disso, os grupos presentes na cadeia molecular da GA (hidroxilas, carboxilatos e aminoácidos) criam microambientes hidrofílicos e hidrofóbicos em meio aquoso (GREIN *et al*, 2013). Sabir *et al* (2012) recentemente descreveu a síntese de AuNPs usando misturas de copolímeros triblocos, de modo a variar o caráter hidrofóbico/hidrofílico do estabilizante e assim controlar o tamanho e a forma das AuNPs. Finalmente, nanopartículas monodispersas são desejáveis, pois o grau de dispersão de tamanhos controla a biodistribuição (PELAZ *et al*, 2012) e também orienta a aplicação das nanopartículas (DAL LAGO *et al*, 2011).

Para avaliar a influência da concentração da GA na formação das AuNPs, foi realizado um estudo comparativo da síntese das AuNPs-GA na presença de solução de GA 0,1 e 1% (m/v). Vários trabalhos mostram que o  $\lambda_{\max}$ , a absorbância e a largura da BP são influenciados pela concentração do agente estabilizante utilizado (ULLAH *et al*, 2011; DEVI *et al*, 2010; VENTOSA *et al*, 2012; WU *et al*, 2010; HUANG e YANG, 2004). As mudanças da BP com as diferentes concentrações do agente estabilizante estão relacionados, principalmente, com o tamanho e a morfologia das partículas, os quais são influenciados pela interação polímero-nanopartícula metálica. Além disso, uma elevada concentração do agente estabilizante pode prejudicar a formação das nanopartículas, podendo dificultar a sua nucleação, além de dificultar a dispersão das partículas formadas e limitar a sua aplicabilidade (WU *et al*, 2010; DEVI *et al*, 2010). Nas nossas condições de síntese, é visto que há a formação das AuNPs na presença de solução de GA 0,1 e 1% (m/v), evidenciado pela formação da BP característica em  $\lambda = 520 - 540$  nm com as subseqüentes adições do  $\text{NaBH}_4$ , FIGURA 11 (A) e (B). Em ambas as condições há o deslocamento da BP para comprimentos de onda menores no decorrer das sínteses e a concentração de GA não influenciou na distância do deslocamento.

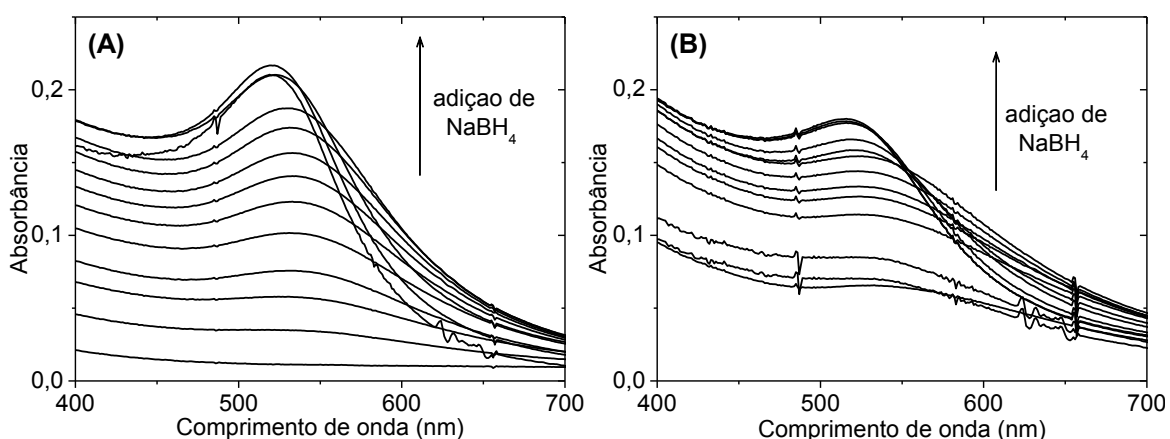


FIGURA 11 - Acompanhamento do perfil de absorção UV-Vis na síntese das AuNPs na presença de GA 0,1 (A) e 1% (m/v) (B) em função das adições sucessivas de  $\text{NaBH}_4$ .

Comparando a última BP de ambas as sínteses (FIGURA 12) é visto que as AuNPs-GA sintetizadas com GA 0,1 e 1% (m/v) apresentam praticamente o mesmo perfil de absorção. Relacionando a FIGURA 12 com as imagens de MET e suas distribuições de tamanho (FIGURA 13), é evidenciado que as nanopartículas sintetizadas utilizando 0,1 e 1 % (m/v) de GA apresentam tamanho e distribuição de tamanho próximos. As AuNPs-GA sintetizadas utilizando GA 0,1% e 1% apresentam tamanho médio de  $5,4 \pm 2,1$  nm e  $5,5 \pm 1,5$  nm, respectivamente, obtidos pelo melhor ajuste Gaussiano nas curvas de distribuição da FIGURA (C) e (D).

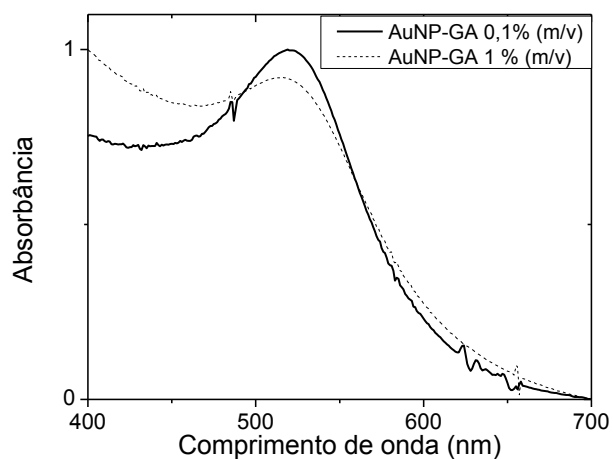


FIGURA 12 - Perfil de absorção da BP ao final da síntese das AuNPs-GA utilizando GA 0,1 e 1% (m/v). As BPs foram normalizadas para efeito comparativo.

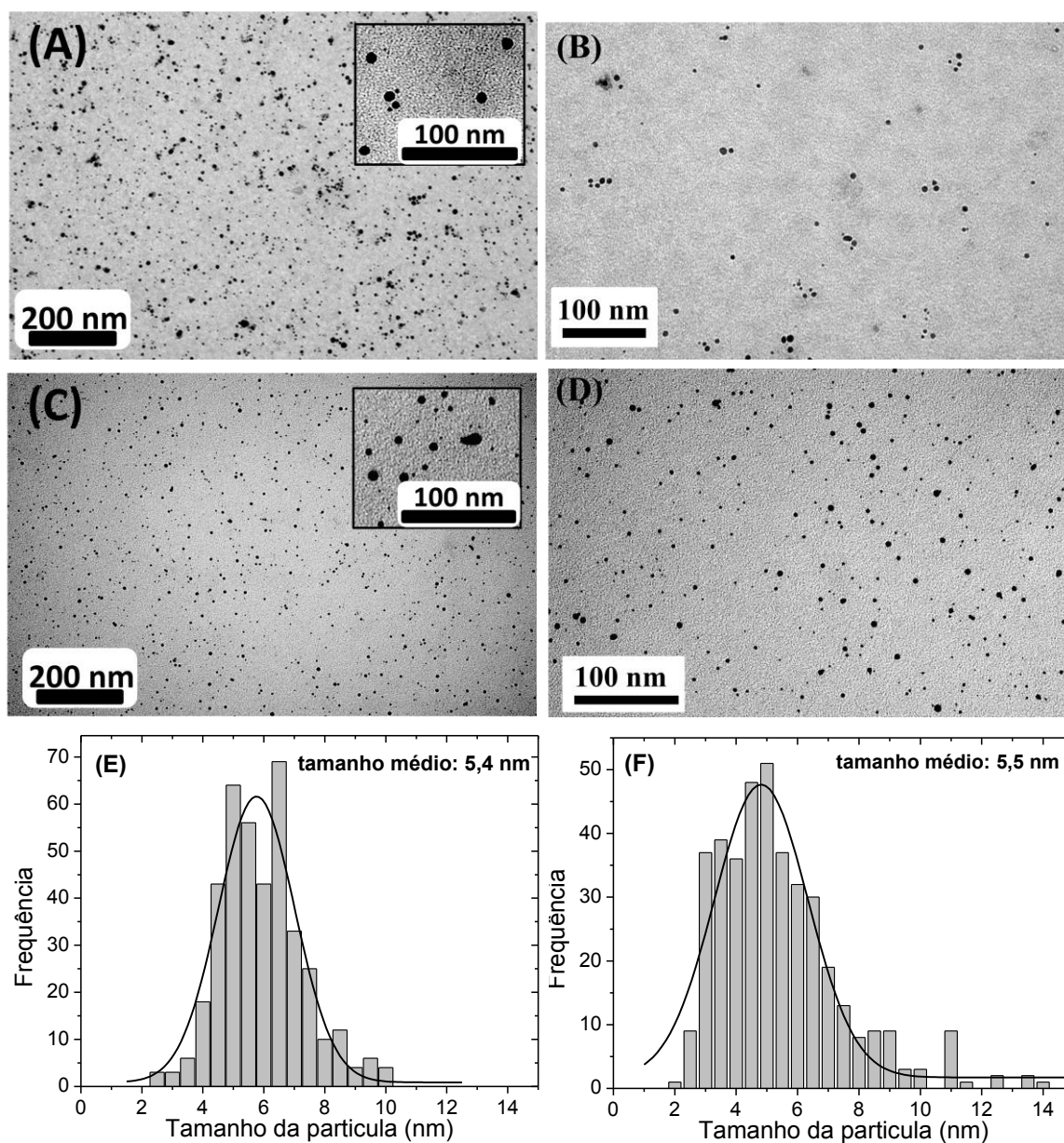


FIGURA 13. Imagens de MET das AuNPs-GA sintetizadas na presença de GA (A e B) 0,1 e (C e D) 1% (m/v) e suas respectivas distribuições de tamanho (E) e (F). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano.

## 4.2 EFEITO DA TEMPERATURA NA SÍNTESE DAS AuNPs-GA

A temperatura de síntese das AuNPs-GA foi variada em 25, 40 e 60 °C. As sínteses das AuNPs-GA sob diferentes temperaturas foram realizadas sempre com a concentração de 0,1% (m/v) de GA. Wu *et al* (2010) variou a temperatura da síntese de AuNPs-GA em 25, 40, 55 e 70°C e não observou diferenças significativas na BP, no tamanho e na distribuição de tamanho das partículas, apenas identificou que há um ligeiro aumento na velocidade de formação das AuNPs. Em nossas condições de síntese, também é observado que não há diferenças significativas nas AuNPs-GA sintetizadas em diferentes temperaturas, como visto pela última BP da síntese das partículas (FIGURA 14) onde o perfil de absorção das BPs é muito similar. O valor de  $\lambda_{\text{max}}$  das AuNPs-GA sintetizadas à 25°C ( $\lambda = 524$  nm) apresenta valor um pouco menor em relação à aquelas sintetizadas à 40 e 60 °C ( $\lambda = 529$  nm). Pelas imagens de MET (FIGURA 15) é confirmado que o tamanho das AuNPs-GA sintetizadas em diferentes temperaturas são aproximados. As AuNPs-GA sintetizadas à 40 e 60 °C apresentam tamanho médio de  $5,4 \pm 1,2$  nm e  $5,6 \pm 1,3$  nm, respectivamente, sendo realmente muito próximos ao tamanho das partículas sintetizadas à 25 °C ( $5,4 \pm 2,1$  nm).

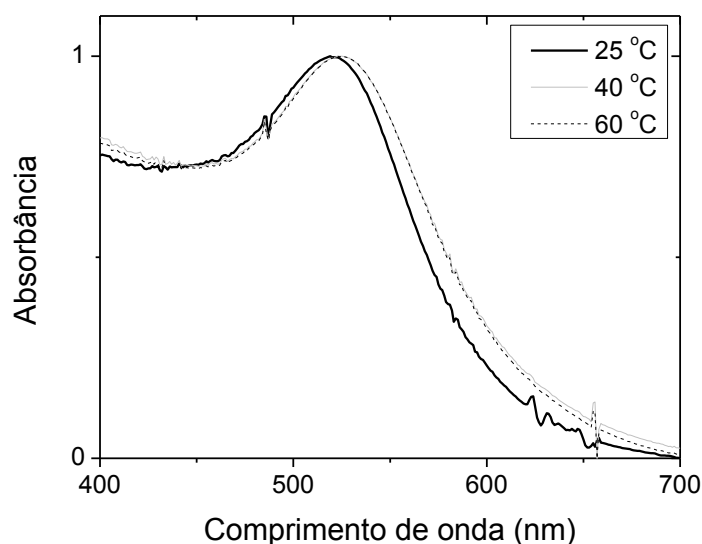


FIGURA 14 - Perfil de absorção da BP ao final das sínteses das AuNPs-GA utilizando GA 0,1% (m/v) sintetizadas à 25, 40 e 60 °C. O máximo das BPs foi normalizado para efeito comparativo.

Como não há uma diferença significativa do tamanho e da distribuição de tamanho das nanopartículas obtidas com a variação da temperatura, foi determinada a condição de 25°C para um método de síntese simples e rápido das AuNPs-GA utilizando condições brandas de síntese. Dessa forma, o uso de um polímero natural associado à

temperatura ambiente de síntese, obtendo nanopartículas com controle de tamanho, faz desse método de síntese um ótimo meio de obtenção de AuNPs estáveis.

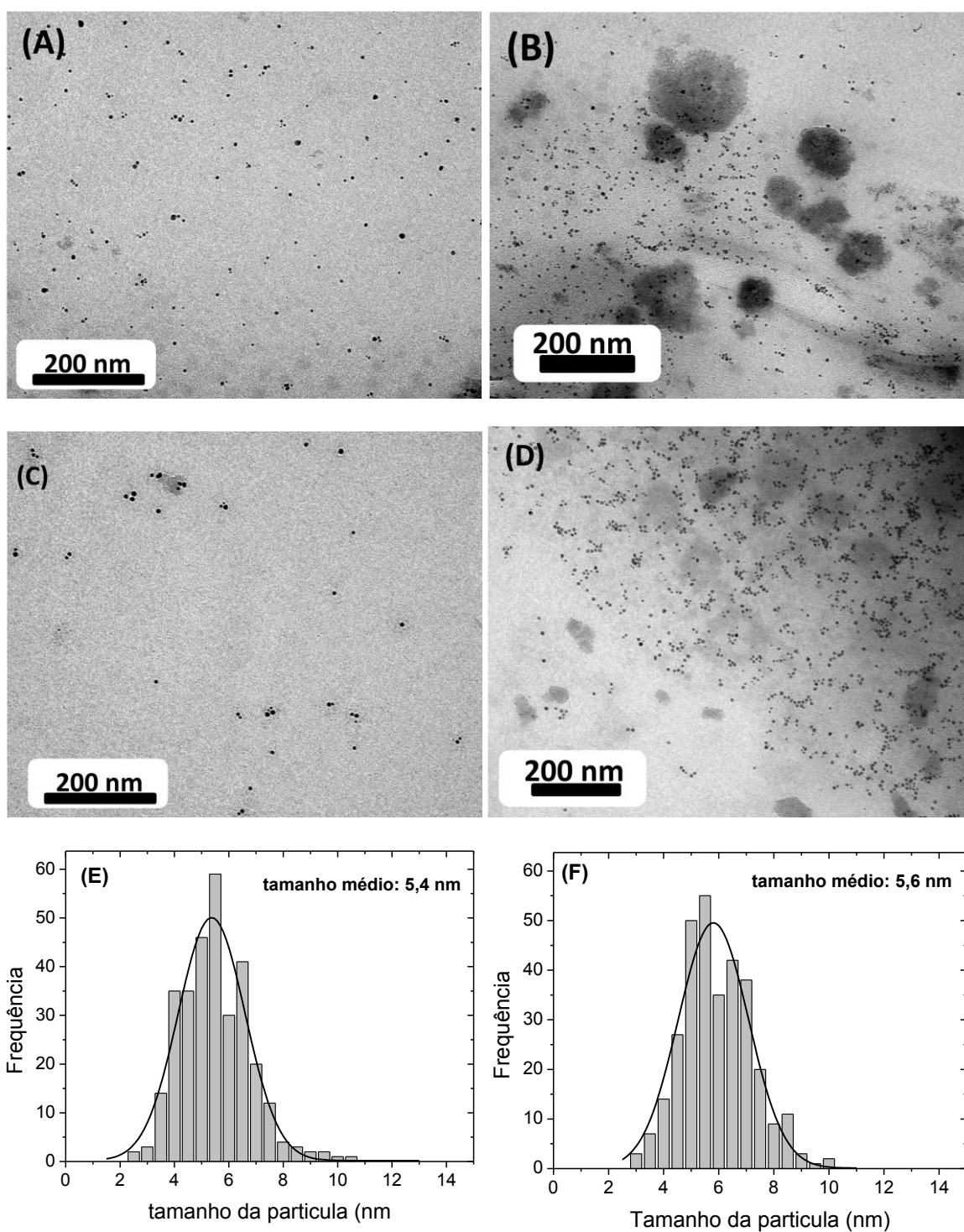


FIGURA 15 – Imagens de MET das AuNPs-GA estabilizadas com GA 0,1% (m/v) sintetizadas à 40 (A e B) e 60 °C (C e D) e as suas respectivas distribuições de tamanho (E) e (F). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano.

#### 4.3 ESTUDO ELETROQUÍMICO DAS AuNPs-GA

Além do acompanhamento por espectroscopia UV-Vis e imagens de MET, foram realizados experimentos voltamétricos para avaliar o comportamento eletroativo das AuNPs-GA em solução. A técnica de voltametria cíclica consiste na varredura do potencial eletroquímico na superfície de um eletrodo, onde é feita a determinação dos potenciais de redução e oxidação das espécies em solução além de ser possível também a determinação do comportamento difusional. A elevada razão superfície/volume, associado à suas propriedades catalíticas, tornam as AuNPs um material interessante de estudo do ponto de vista eletroquímico (WANG *et al*, 2011; GUO e WANG, 2007). Portanto, associado também a sua biocompatibilidade e ao seu pequeno tamanho, as AuNPs tem sido um material atrativo para aplicação biomédica pela sua capacidade difusional, o que as permitem atravessarem por membranas biológicas atingindo o interior das células (FENT *et al*, 2009).

As voltametrias foram feitas diretamente nas soluções das sínteses de AuNPs-GA estabilizadas por 0,1 e 1 % (m/v) de GA, FIGURA 16. Os brancos foram feitos na ausência de  $\text{AuCl}_4^-$ , onde é claramente visto que a GA não apresenta nenhuma eletroatividade na janela de potencial estudado. Amostras com concentrações diferentes de GA apresentam perfis voltamétricos diferentes, indicando que a concentração do agente estabilizante utilizado influencia nas propriedades eletroquímicas das nanopartículas. Ambas as amostras apresentam uma onda anódica em + 0,32 V, com a respectiva onda catódica em 0,25 V, sendo este processo mais discreto se comparado com o processo de oxidação. Porém, há outra onda anódica mais estreita em + 0,54 V com o respectivo processo catódico em 0,47 V apenas para a amostra contendo menor concentração de GA. Esta onda anódica mais estreita indica a presença de uma espécie muito pequena ou mesmo dissolvida na solução, pois os processos de transporte de massa de partículas menores são mais facilitados, conseqüentemente, há o aumento da difusão em solução.

Como as duas amostras foram sintetizadas com os mesmos reagentes, o processo encontrado em 0,54 V pode ser referente a partículas menores de ouro que estão dissolvidas em solução que não são vistas pelas imagens de MET. Ao mesmo tempo, a maior concentração de GA envolvendo as AuNPs prejudica a difusão das partículas para atingirem a superfície do eletrodo. Devido a elevada razão superfície/volume e propriedades de transporte de elétrons das AuNPs, a sua eletroatividade é prejudicada pela adsorção de uma concentração maior de GA na superfície das partículas, principalmente na difusão das nanopartículas estabilizadas com uma maior concentração de GA (WANG *et al*, 2011). Portanto, uma maior concentração

do agente estabilizante pode dificultar a difusão das nanopartículas e limitar sua aplicação para fins biológicos.

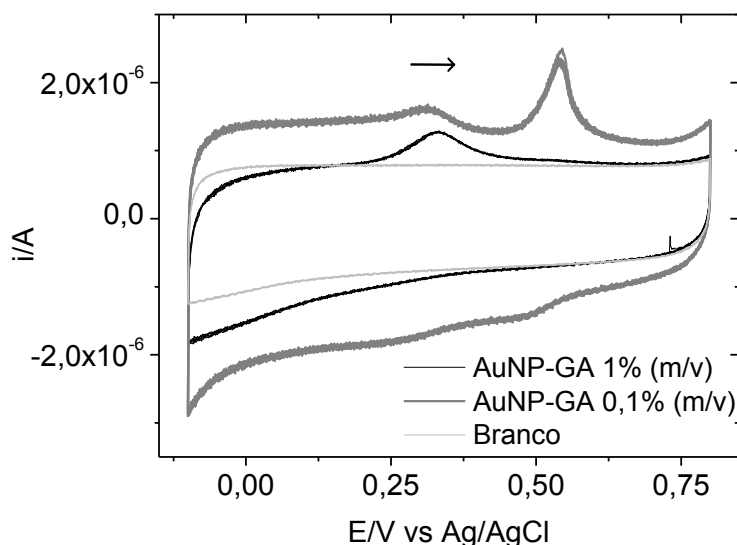


FIGURA 16 - Voltametria cíclica em solução das AuNPs-GA sintetizadas na presença de GA 0,1 e 1% (m/v) utilizando velocidade de varredura de 100 mV/s. O branco foi feito na ausência de  $\text{AuCl}_4^-$ .

#### 4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE *IN VITRO* DAS AuNPs-GA

O estudo de estabilidade *in vitro* foi feito para avaliar o comportamento das AuNPs-GA em fluidos de condições fisiológicas de diferentes pHs. Para efeito comparativo, o mesmo estudo foi feito para as AuNPs sintetizadas na ausência da GA.

Primeiramente, medidas de potencial zeta ( $\zeta$ ) das AuNPs-GA e AuNPs foram feitas para relacionar a presença de GA e a carga superficial total das nanopartículas. Como observado na FIGURA 17 (A), as amostras de AuNPs-GA e AuNPs apresentam carga superficial líquida negativa variando de -35 a -10 mV ( $\zeta_{\text{max}} = -22,3$  mV) e de -50 a -10 mV ( $\zeta_{\text{max}} = -28,2$  mV), respectivamente. No caso das AuNPs, a origem da carga superficial negativa é provavelmente devido a adsorção na superfície de íons  $\text{AuCl}_4^-/\text{AuCl}_2^-$  (CHEN *et al*, 2012). Por outro lado, a origem da carga negativa das AuNPs-GA pode ser proveniente dos grupos funcionais ionizados da GA, como os carboxilatos (procedentes de componentes monossacarídeos ácidos) (GREIN *et al*, 2013) e aminoácidos (procedentes de frações protéicas, compostos principalmente por hidroxiprolina, serina e treonina) (WANG *et al*, 1991), pois as medidas de potencial zeta determinam a carga superficial das partículas, ou seja, o potencial zeta obtido para as AuNPs-GA é proveniente da GA adsorvida na superfície das nanopartículas (FIGURA 17 (B)). Portanto, de acordo com o pH do meio, espécies catiônicas e aniônicas podem ser formadas. Sendo assim, na condição utilizada no experimento (pH~5), é indicativo que os grupos carboxílicos estão dissociados enquanto os grupos aminoácidos estão

protonados, resultando em uma carga superficial das AuNPs-GA levemente menos negativa do que as AuNPs.

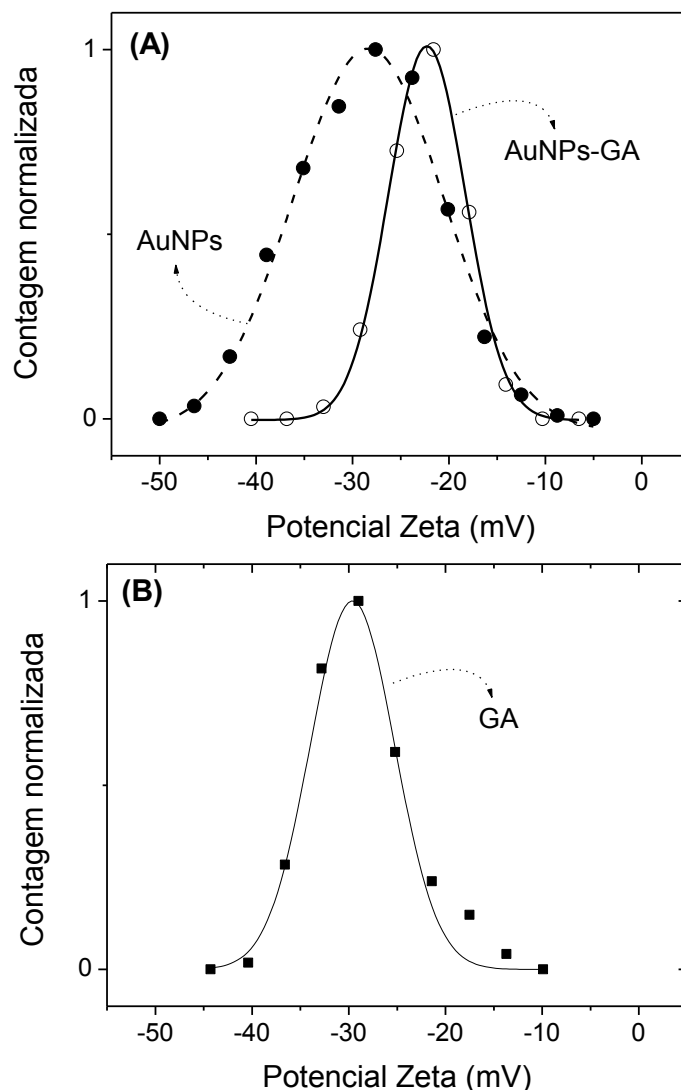


FIGURA 17. Curvas de potencial Zeta e os correspondentes ajustes Gaussianos das (A) AuNPs-GA, AuNPs e (B) GA.

Além de avaliar a estabilidade das AuNPs-GA, o estudo *in vitro* foi realizado para demonstrar a origem da estabilidade superior das AuNPs-GA em relação às AuNPs. Ambas as amostras foram dispersas em fluidos de simulação gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8) mantidas à temperatura corporal (37°C) e suas propriedades foram analisadas diariamente durante 7 dias. A FIGURA 18 apresenta a BP das AuNPs-GA e AuNPs em pHs diferentes durante o período acompanhado. O pH 5,5 é o valor do pH das amostras após a síntese, sendo essas consideradas como amostras controle no estudo de estabilidade. O pH das amostras foi verificado diariamente para demonstrar a manutenção do pH durante o período acompanhado.

As AuNPs-GA apresentam notável estabilidade em todos os meios estudados, como demonstrado pela conservação do perfil de absorção das BPs durante os dias



estudados nas FIGURAS 18 (A), (B) e (C). A estabilidade das dispersões é também comprovada pela conservação da cor roxo-avermelhada característica das AuNPs-GA. Por outro lado, é evidente que há agregação das AuNPs sintetizadas na ausência da GA logo nas primeiras 24 horas em pH 5,5 e 6,8, FIGURAS 18 (D) e (E), respectivamente. Este processo de agregação é visto principalmente pela mudança do  $\lambda_{\max}$  para maiores comprimentos de onda e pelo aumento da largura da BP, os quais indicam o aumento do tamanho das partículas. Após a adição das AuNPs em fluido gástrico, a BP desaparece instantaneamente (FIGURA 18 (F)) e a cor característica roxo-avermelhada da dispersão de AuNPs se torna incolor. Essas mudanças evidenciam a perda das propriedades nanométricas das AuNPs.

Kattumuri *et al* (2007) demonstraram a elevada estabilidade das AuNPs estabilizadas por GA em meio aquoso contendo cisteína, histidina, albumina de soro humano e cloreto de sódio, em pHs próximos ao pH fisiológico (pH ~7). Em nosso estudo, as AuNPs-GA foram submetidas a mudanças significativas de pH e, em todos os casos, a conservação das características da BP (a mudança no  $\lambda_{\max}$  da BP foi de ~3 nm em pH 1,2) indica a sua elevada estabilidade. Com a permanência das características da BP até o sétimo dia, as AuNPs-GA se mostram estáveis por longos períodos. É importante dizer que, de acordo com o nosso método de preparação, as AuNPs estão muito diluídas, simulando as condições reais de aplicações biomédicas (DE OLIVEIRA *et al*, 2013).

Assim como nos espectros UV-Vis, é visto pelas imagens de MET (FIGURA 19 (A)) que as AuNPs sintetizadas na ausência da GA apresentam a tendência de agregação em pH intestinal logo no início do teste *in vitro* e essa tendência se mantém durante o período acompanhado (FIGURA 19 (B)). Pelo ajuste Gaussiano das curvas de distribuição de tamanho, as AuNPs apresentam tamanho médio de  $14,2 \pm 6,6$  nm e  $17,6 \pm 4,1$  nm no início e no final do período acompanhado, respectivamente (FIGURA 19 (C) e (D)). Pelas imagens de MET é também observado que ao final do teste as AuNPs não permanecem tão bem definidas por formarem aglomerados e, assim, perdendo sua forma esférica. Dessa forma, as imagens de MET confirmam a instabilidade das AuNPs nos pHs estudados, como visto dos espectros UV-Vis. Não foram feitas imagens de MET das AuNPs dispersas em pH gástrico por estas perderem as suas propriedades de nanopartículas, evidenciado pelo desaparecimento da absorção da BP e cor características.

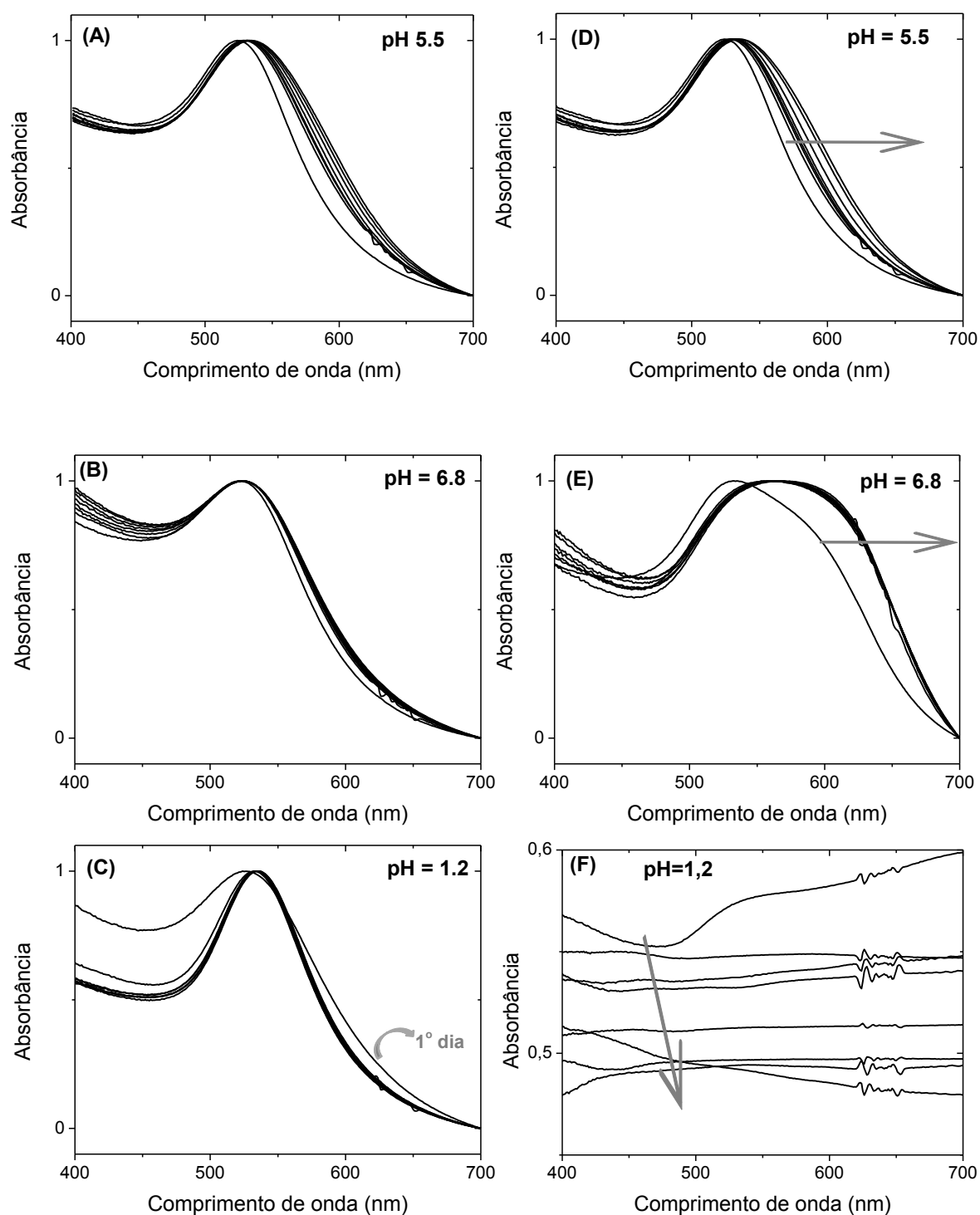


FIGURA 18 – Espectro de absorção das AuNPs-GA (A, B, C) e AuNPs (D, E, F) mantidas à 37 °C durante 7 dias nos respectivos pHs: 5,5, 6,8 e 1,2. As setas indicam a orientação das BPs durante os dias acompanhados. As BPs foram normalizadas para efeito comparativo.

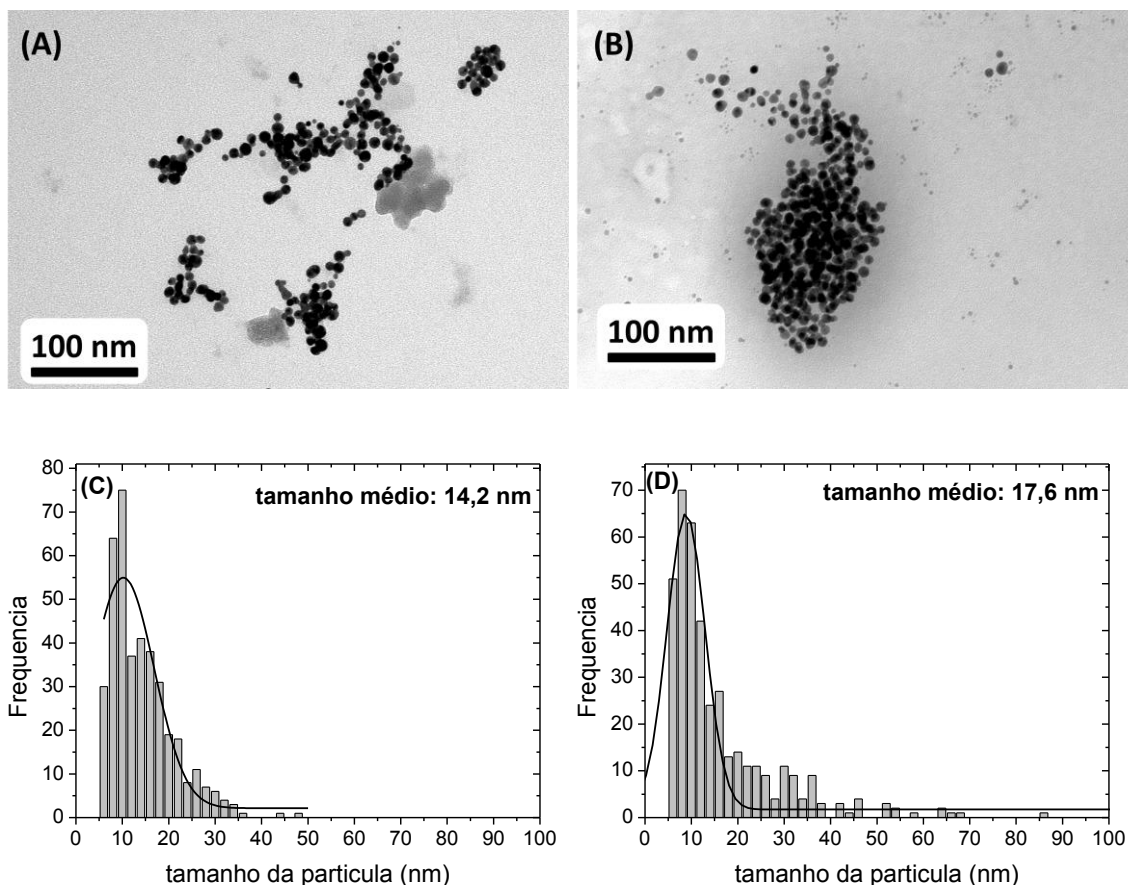


FIGURA 19 – Imagens de MET das AuNPs sintetizadas na ausência de GA dispersas em fluido de pH intestinal (pH= 6,8) no início (A) e no final (B) do teste *in vitro* durante 7 dias, à 37 °C, e suas respectivas distribuições de tamanho (C) e (D). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano.

As imagens de MET obtidas no início e no final do teste de estabilidade das AuNPs-GA confirmam os resultados obtidos por espectroscopia UV-Vis, FIGURA 20 (A), (B) (C) e (D). De acordo com o ajuste Gaussiano na curva de distribuição de tamanho (FIGURA 20 (E) e (F)), as AuNPs-GA dispersas em fluido de simulação de pH intestinal apresentam tamanho médio de  $4,8 \pm 1,6$  nm e  $5,2 \pm 1,9$  nm no início e no final do teste de estabilidade, respectivamente. As AuNPs dispersas em fluido de simulação gástrico apresentam tamanho médio de  $5,4 \pm 1,6$  nm no início e  $5,6 \pm 1,6$  nm no final do período acompanhado, FIGURAS 20 (G) e (H). Dessa maneira, é demonstrada a conservação do tamanho das partículas durante o teste em ambos fluidos. As imagens de MET também indicam que o formato esférico das AuNPs-GA é mantido durante o estudo *in vitro*. Portanto, por espectroscopia UV-Vis e imagens de MET, é comprovado que as AuNPs-GA se mantêm muito estáveis sob os pHs estudados, à 37 °C, durante 7 dias. Considerando uma futura aplicação biológica, este é um importante resultado devido à forte dependência que há entre o tamanho das nanopartículas e suas propriedades.

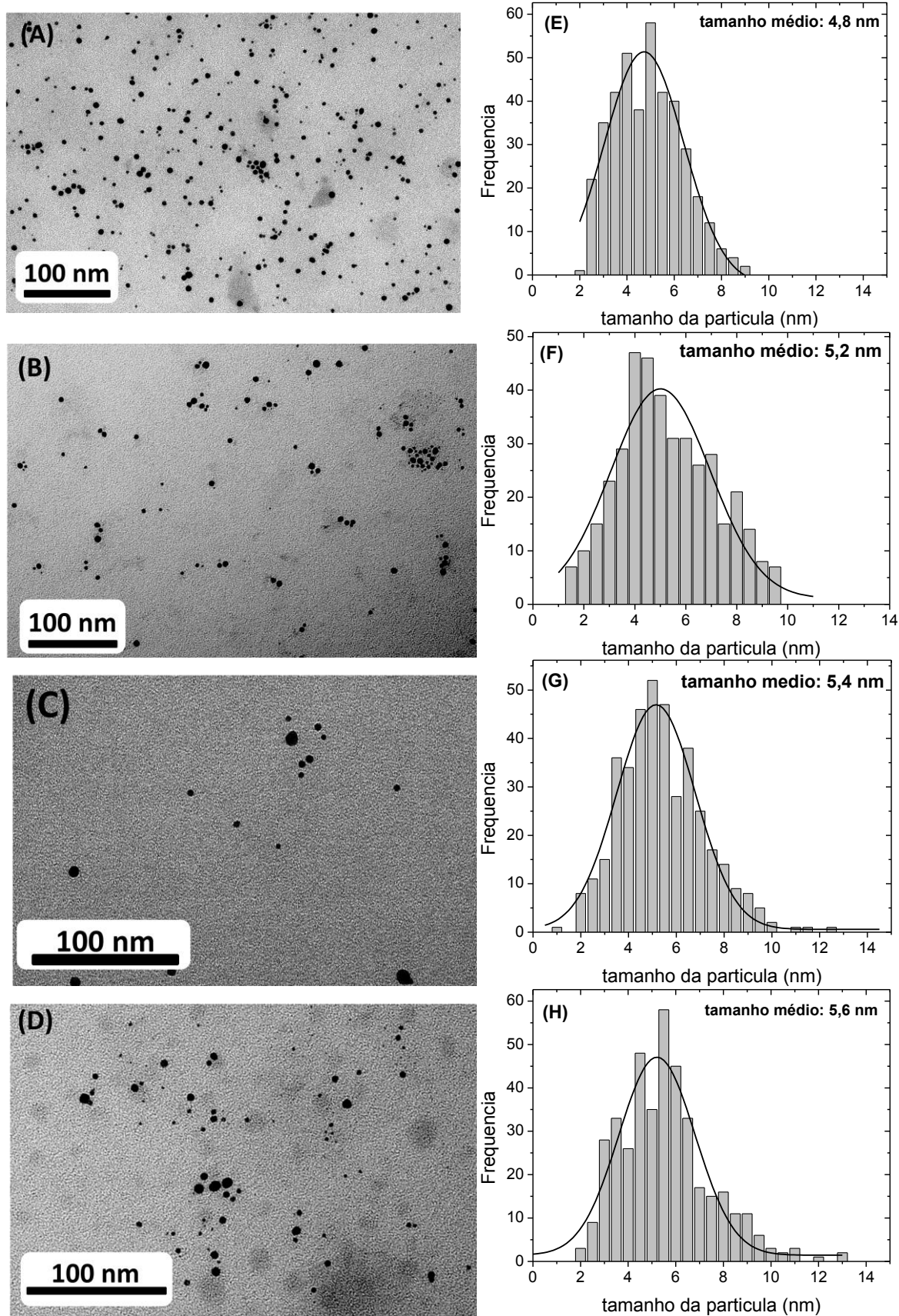


FIGURA 20 - Imagens de MET das AuNPs-GA dispersas em fluído de pH intestinal (pH= 6,8) (A e B) e gástrico (pH= 1,2) (C e D) no início (A e C) e no final (B e D) do teste *in vitro* durante 7 dias, à 37 °C, e suas respectivas distribuições de tamanho (E), (F), (G) e (H). As linhas correspondem ao melhor ajuste Gaussiano.

Medidas de  $\zeta$  foram feitas a fim de correlacionar a carga superficial residual das AuNPs-GA e sua estabilidade quando dispersas em fluidos simulados, FIGURA 21. Em pH 5,5, o  $\zeta$  permanece praticamente constante (-23 mV) durante os 7 dias no teste *in vitro*. Em pH 6,8, um ligeiro aumento é observado no terceiro dia (-19 mV), permanecendo constante nos próximos dias acompanhados. No entanto, após a dispersão de AuNPs-GA em fluido simulado de pH gástrico (pH 1,2), o  $\zeta$  muda para aproximadamente zero (-2 mV). Considerando que os valores de  $\zeta$  entre -25 mV e + 25 mV são normalmente relacionados com sistemas instáveis (PRATHNA *et al*, 2011; KIM *et al*, 2005; KIM *et al*, 2008), as nanopartículas dispersas em pH 1,2 seriam provavelmente muito instáveis se considerado a estabilização eletrostática como principal forma de estabilização das AuNPs pela GA.

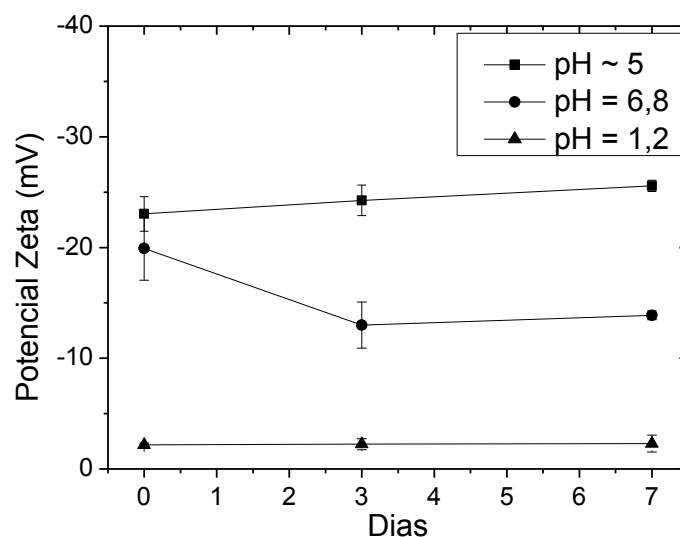


FIGURA 21. Valores de potencial zeta das AuNPs-GA sintetizadas (pH~5) e dispersas em fluido de simulação de pH intestinal (pH = 6,8) e gástrico (pH = 1,2) medidos no início, no terceiro e no sétimo dia do teste de estabilidade *in vitro*.

Baseado na teoria de Derjagin-Landau e Verwey-Overbeek (DLVO), a qual considera que a estabilidade coloidal é governada pelo balanço de repulsão eletrostática *versus* a atração de van der Waals entre as partículas, a agregação das AuNPs e AuNPs-GA pode ser favorável em pHs baixos desde que ambas sejam carregadas negativamente. O mecanismo de agregação inclui o aumento das forças atrativas de van der Waals entre as partículas devido à redução da carga superficial por espécies catiônicas. Além disso, em qualquer valor de pH, o aumento da força iônica da solução coloidal de ouro reduz o efeito da dupla camada elétrica, favorecendo as interações entre as partículas e levando a agregação. Porém, a teoria DLVO apresenta limitações por avaliar apenas a estabilização eletrostática, desconsiderando a estabilização estérica dos colóides (BOSTROM *et al*, 2001). Em nossos estudos é visto que apenas as AuNPs

apresentam a tendência de agregação enquanto as AuNPs-GA são estáveis mesmo em diferentes pHs. Dessa maneira, como há o aumento da força iônica do meio com a variação do pH das amostras, é demonstrado que a estabilização das AuNPs pela GA ocorre principalmente via estabilização estérica. Além disso, estudos realizados adicionando diretamente sal na dispersão de AuNPs-GA confirmam a estabilização não estar apenas relacionada aos mecanismos eletrostáticos por não ter sido observada agregação das partículas mesmo em elevadas concentrações de sal. As medidas de potencial zeta são determinadas na camada de Stern (região entre a superfície do colóide e a camada difusa). O aumento da força iônica do meio diminui o valor do potencial zeta, favorecendo as interações atrativas entre as partículas levando a agregação, FIGURA 22. Dessa maneira, as medidas de potencial zeta não podem ser aplicadas diretamente na avaliação do comportamento de colóides estabilizados estericamente.

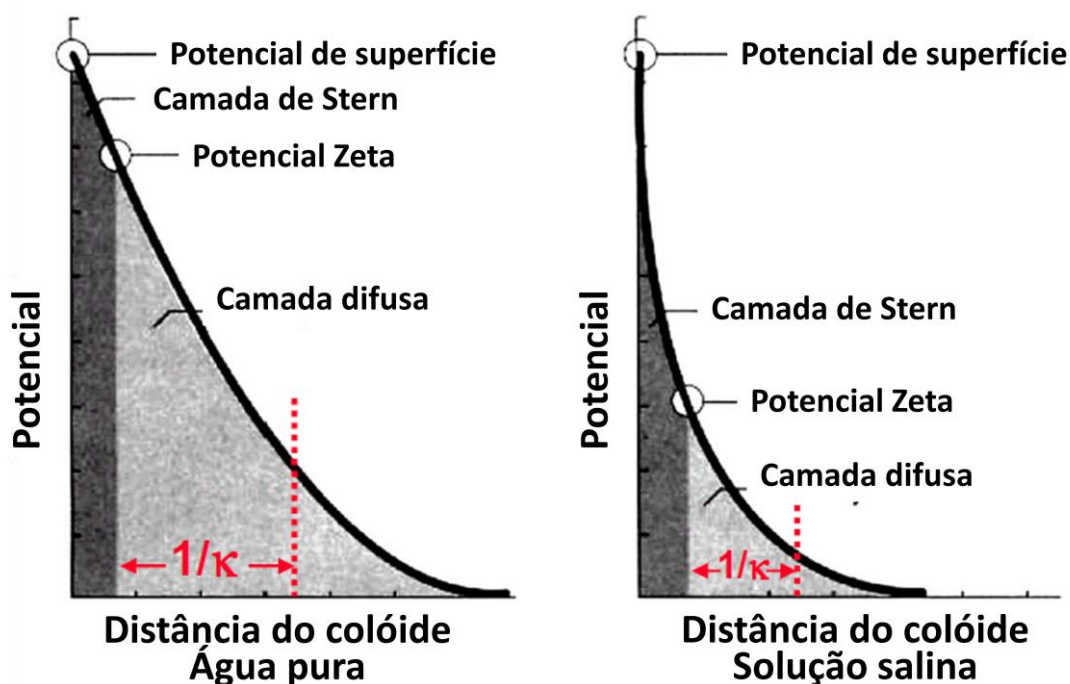


FIGURA 22. Ilustração esquemática das camadas de potencial dos íons ao redor de um colóide em função da distância em água pura e em solução salina.

Fonte: QUINA (2014).

Considerando os vários grupos funcionais presentes na cadeia macromolecular da GA, espécies aniônicas e catiônicas são formadas dependendo do pH da solução. Neste estudo, os grupos amino estão protonados em todos os pHs analisados enquanto os grupos carboxílicos estão dissociados em pH 5,5 e 6,8. Um estudo sistemático, feito por Zakaria *et al* (2013), demonstrou que as AuNPs se agregam mais rapidamente em meio ácido na presença de pequenas moléculas e de aminoácidos. Nestes casos, as nanopartículas se mantêm estáveis apenas na presença de grupos carboxilatos.

Kattumuri *et al* (2007) atribuíram a estabilidade das AuNPs-GA em vários meios fisiológicos à natureza da fração rica em proteína da GA. Porém, a composição da amostra de GA utilizada nesse trabalho contém 4% de componentes protéicos e a notável estabilidade observada para as AuNPs-GA não pode ser atribuída apenas a presença de proteínas e a natureza de seus resíduos de aminoácidos.

Materiais poliméricos são utilizados há muito tempo como estabilizantes para uma variedade de materiais. O sucesso dos polímeros em estabilizar esses materiais é atribuído ao efeito estérico e as forças de depleção (LEE, 2008). O mecanismo de estabilização normalmente é relacionado à adsorção de polímeros, polieletrólitos e biomoléculas na superfície coloidal. Nestes casos, a interação polímero-solvente tem um papel importante na estabilização via repulsões estéricas. À medida que duas partículas coloidais se aproximam, a pressão osmótica entre elas aumenta devido ao confinamento espacial das moléculas poliméricas adsorvidas, resultando em interações repulsivas. Considerando os resultados obtidos, a estabilidade das AuNPs-GA pode ser atribuída principalmente a existência de forças estéricas as quais evitam a agregação das nanopartículas independentemente do pH. Mesmo atingindo valores de  $\zeta$  próximos de zero (-2 mV), as AuNPs-GA apresentam notável estabilidade, durante 7 dias, em meio aquoso, FIGURA 23.

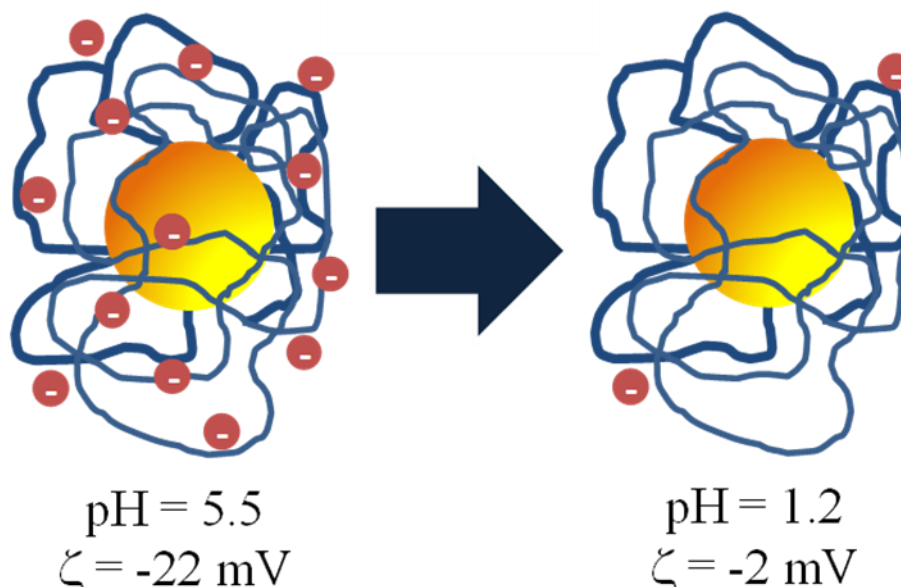


FIGURA 23. Ilustração esquemática da estabilização estérica das AuNPs proveniente da GA mesmo em baixos valores de pH onde o potencial zeta atinge valores próximos de zero.

#### 4.5 ENSAIO BIOLÓGICO

Foram realizados experimentos para avaliar a viabilidade de células de melanoma (linhagem B16F10 - câncer que atinge o tecido epitelial) na presença das AuNPs-GA. Foram utilizados os métodos de Vermelho Neutro e MTT. O Vermelho Neutro é um corante hidrofóbico que quando internalizado pela célula é protonado em compartimentos celulares específicos e permanece no interior de células viáveis. O MTT pode ser facilmente reduzido por enzimas mitocondriais em células viáveis, resultando em cristais que podem ser dissolvidos e analisados. A viabilidade das células expostas as AuNPs-GA foram determinadas em relação as células controles, onde estas foram mantidas em cultivo celular na ausência de AuNPs-GA. É considerado um percentual confiável de viabilidade celular em torno de 90%, sendo que sempre existirá processo de morte celular para qualquer manutenção em cultivo mesmo na ausência de tratamento.

Como as nanopartículas estão estabilizadas pela GA, os mesmos ensaios foram feitos utilizando somente a solução de GA para comparação. Dessa forma, foi avaliado se o efeito sobre as células B16F10 ocorre também pela presença de GA. Como visto pela FIGURA 24, a viabilidade celular para os tratamentos utilizando AuNPs-GA diminui em comparação aqueles utilizando apenas solução de GA (aproximadamente 10%). Portanto, a perda de viabilidade celular em células B16F10 observada ocorre pela presença das nanopartículas, não havendo interferência pela presença da GA utilizada como agente estabilizante.

Vijayakumar e Ganesan (2012) também observaram por ensaios de MTT que não houve citotoxicidade celular com a presença GA utilizada como agente estabilizante em AuNPs-GA com tamanho médio de 20 nm em células MCF-7 (células de câncer de mama) e PC-3 (células de câncer de próstata). Nishi e Jayakrishnan (2007) demonstraram que utilizando apenas a solução aquosa de GA nos ensaios de citotoxicidade por MTT não houve perda de viabilidade celular em células L<sub>929</sub> (células tronco embrionárias humanas), mesmo em concentrações elevadas deste polissacarídeo. Portanto, considerando que é bem estabelecido que a GA não é tóxica, sendo esta uma das vantagens por ser muito empregada na indústria alimentícia e farmacêutica, e pelos resultados de viabilidade celular apresentados é evidente que a causa da perda de viabilidade celular das células B16F10 expostas às AuNPs-GA ocorre exclusivamente devido as AuNPs.



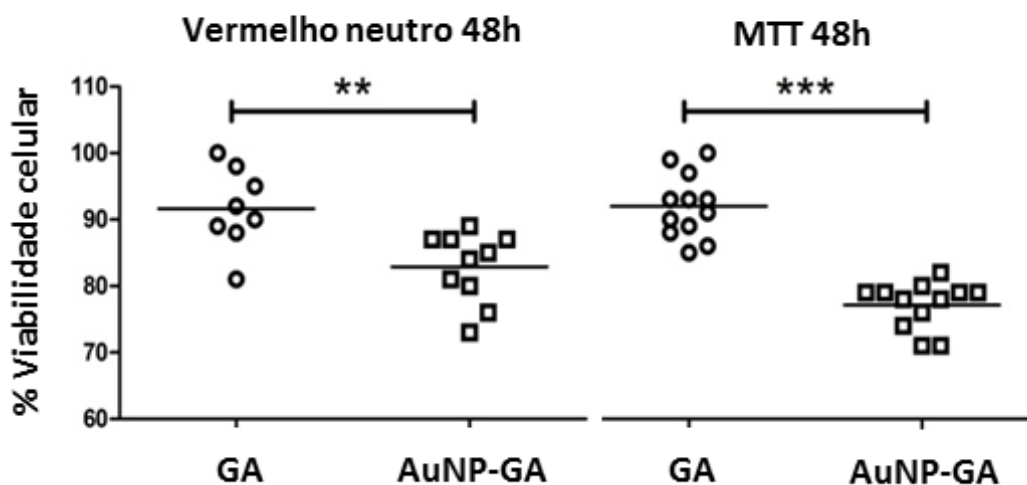


FIGURA 24. Ensaio de viabilidade celular utilizando os métodos de Vermelho Neutro e MTT em células B16F10 expostas a 100  $\mu$ L de GA e AuNP-GA por um período de tratamento de 48 horas.

Além disso, também foram realizados um estudo preliminar utilizando células não cancerígenas 3t3 (células embrionárias de fibroblastos de camundongo) e RAW (células macrófagos monócitos leucêmicos de camundongos) expostas as AuNPs-GA, onde foi evidenciado que não houve nenhuma diferença entre as células controle e as expostas às AuNPs-GA. Portanto, as AuNPs-GA não diminuem a viabilidade celular das células saudáveis, sendo que elas apresentam essa capacidade apenas para as células cancerígenas. Dessa maneira, as AuNPs-GA apontam ser um excelente meio de identificar células tumorais poupando as células saudáveis, sendo esse um grande avanço no diagnóstico e tratamento do câncer em comparação aos métodos atuais, como a quimioterapia e radioterapia, os quais debilitam ainda mais a saúde do paciente.

#### 4.6 DISCUSSÃO GERAL

Comparando os resultados obtidos com os trabalhos presentes na literatura, é encontrado que outros autores já sintetizaram AuNPs estabilizadas por GA. Wu *et al* (2010) preparou AuNPs-GA na ausência de um agente redutor. Partículas de tamanho  $\sim 21,1 \pm 4,6$  nm foram obtidas utilizando solução de GA 1% (m/v) à 55 °C durante 4 horas. Em nosso estudo, sob as condições de síntese utilizadas, não é possível obter AuNPs sem a presença de  $\text{NaBH}_4$ . Em paralelo, Medina-Ramirez (2009) utilizou ácido ascórbico (AA) como agente redutor e a síntese foi realizada à 60 °C sob elevada agitação ( $\sim 1000$

rpm), obtendo partículas semi-esféricas com tamanho variando de 20 a 30 nm. Condições mais severas de síntese das AuNPs-GA também são encontradas. Wang *et al* (2012) utilizou sonicação para uma melhor dispersão da solução aquosa de GA. Outros grupos sintetizam as AuNPs-GA sob refluxo (aquecimento até a ebulição) (KANNAN *et al*, 2012; KATTUMURI *et al*, 2007) obtendo partículas com diâmetro médio de 15-20 nm. Comparado aos outros estudos, nós obtivemos AuNPs utilizando GA como agente estabilizante menores por um método simples e rápido sob condições brandas de síntese (25 °C).

Além disso, a obtenção de nanopartículas estáveis e monodispersas são propriedades essenciais para aplicação biomédica. Vários órgãos do corpo humano atuam como filtros de tamanho seletivo, como por exemplo, os rins. Nanopartículas pequenas (< 5 – 15 nm) são rapidamente excretadas pelos rins e assim eliminadas do corpo. Por outro lado, nanopartículas maiores (> 200 nm) são facilmente detectadas pelo sistema imunológico, sendo removidas da circulação sanguínea e, em seguida, entregues a órgãos como o fígado e o baço, podendo em último grau atingir até os ossos. Portanto, a monodispersidade das nanopartículas é fundamental no controle da biodistribuição. Ao mesmo tempo, não é possível saber corretamente os efeitos citotóxicos para as nanopartículas que não apresentam tamanho bem definido (PELAZ *et al*, 2012). Sendo assim, as AuNPs-GA obtidas pelo nosso método de síntese apresentam grande propensão para a aplicação biológica. Além disso, pelos testes preliminares realizados com células tumorais (B16F10 – células de melanoma) expostas às AuNPs-GA, foi evidenciada a diminuição da viabilidade celular e a capacidade de detecção de células tumorais pelas nanopartículas de ouro.

## 5. CONCLUSÕES

Nanopartículas de ouro estabilizadas por goma arábica foram obtidas por um método simples e rápido utilizando condições brandas de síntese. As nanopartículas de ouro estabilizadas por goma arábica (AuNPs-GA) apresentam pequeno tamanho (~ 5 nm) e distribuição de tamanho estreita. A GA atua como um excelente agente estabilizante controlando a formação das AuNPs durante a síntese. No entanto, as AuNPs sintetizadas na ausência de GA apresentam maior tamanho (~ 16 nm), polidispersas e com formação de agregados de partículas com formatos irregulares. Variando as condições de síntese, tais como concentração da GA e temperatura, não foram observadas mudanças significativas no tamanho e distribuição de tamanho das partículas, sendo então considerada a condição de 0,1% (m/v) de GA e 25 °C de temperatura por serem condições brandas de síntese. Além disso, por estudos eletroquímicos foi observado que utilizando uma concentração maior de GA na estabilização das AuNPs, a difusibilidade em solução das partículas é prejudicada, não sendo portanto adequada para aplicações biomédicas por dificultar que as AuNPs passem por membranas biológicas. O estudo de estabilidade *in vitro* confirmou a estabilização das AuNPs pela ação da GA em fluidos de simulação de pH intestinal (pH 6,8) e gástrico (pH 1,2) à 37 °C durante 7 dias. Por outro lado, as AuNPs sintetizadas na ausência de GA são muito instáveis, especialmente em pH gástrico, perdendo suas propriedades de nanopartículas já no começo do teste de estabilidade. A estabilidade das AuNPs-GA foi atribuída principalmente pela existência de forças estéricas que previnem a agregação das nanopartículas independente do pH. Nossos resultados demonstram a habilidade da GA em promover a estabilidade *in vitro* das AuNPs por pelo menos 7 dias, representando informações importantes para o uso seguro das AuNPs-GA em uma variedade de aplicações. Além disso, ensaios biológicos realizados com células B16F10 expostas às AuNPs-GA mostram a capacidade de diminuição de viabilidade celular e detecção de células cancerígenas.

## REFERÊNCIAS

AL-ASSAFA, S.; PHILLIPS, G. O.; AOKIA, H.; SASAKI, Y. Characterization and properties of Acacia senegal (L.) Willd. var. senegal with enhanced properties (Acacia (sen) SUPER GUM™): Part 1—Controlled maturation of Acacia Senegal var. senegal to increase viscoelasticity, produce a hydrogel form and convert a poor into a good emulsifier. **Food Hydrocolloids**, 21, 319-328, 2007.

AO, Y.; XU, J.; FU, D.; YUAN, C. Preparation of Ag-doped mesoporous titania and its enhanced photocatalytic activity under UV light irradiation. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, 69, 2660 – 2664, 2008.

ASTRUC, D. e DANIEL, M. C., Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Review**, 104, 293-346, 2004.

BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Review**, 60, 1289-306, 2008.

BOISSELER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chemical Society Review**, 38, 1759-1782, 2009.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A simple quantitative procedure using monolayers cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of tissue cultures methods**, 9, 7-9, 1985.

BOSTROM, M.; WILLIAMS, D. R. M.; NINHAM, B. W. Specific ion effects: Why DLVO theory fails for biology and colloid systems. **Physical Review Letters**, 87, 1681031 – 1681034, 2001.

CAO, G. **Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and application**. 1 ed. London:Imperial College Press, 2004.

CHANDA, N.; KAN, P.; LISA D. W.; SHUKLA, R.; ZAMBRE, A.; CAMARCK, T. L.; *et al.* Radioactive gold nanoparticles in cancer therapy: therapeutic efficacy studies of GA-198AuNP nanoconstruct in prostate tumor-bearing mice. **Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 6, 201–209, 2010.

CHANDA, N.; UPENDRAN, A.; BOOTE, E. J.; ZAMBRE, A.; AXIAK, S.; SELTING, K.; KATTI, K. V.; LEEVY, W. M.; AFRASIABI, Z.; VIMAL, J.; SINGH, J.; LATTIMER, J. C.; KANNAN, R. Gold Nanoparticle Based X-Ray Contrast Agent for Tumor Imaging in Mice and Dog: A Potential Nano-Platform for Computer Tomography Theranostics. **J. Biomed. Nanotechnol.** 10, 383-392, 2014.

CHEN, W.; DENG, H. H.; HONG, L.; WU, Z. Q.; WANG, S.; LIU, A. L.; LIN, X. H.; X. X. H. Bare gold nanoparticles as facile and sensitive colorimetric probe for melamine detection. **Analyst**. 137, 5382-5386, 2012.

DAI, S; RAVI, P.; TAM, K. C. pH-responsive polymers: synthesis, properties and applications. **Soft Matter**, 4, 435-449, 2008.

DAL LAGO, V.; DE OLIVEIRA, L. F.; GONÇALVES, K. L.; KOBARG J.; CARDOSO, M. B. Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties **J. Mater. Chem.** 21, 12267-12273, 2011.

DE OLIVEIRA, L. F.; DE GONÇALVES, J. O.; DE GONÇALVES, K. A.; KOBARG, J.; CARDOSO, M. B. Sweeter but deadlier: decoupling size, charge and capping effects in carbohydrate coated bactericidal silver nanoparticles. **J. Biom. Nanotechnol.** 9, 1817-1826, 2013.

DEVI, D. K.; PRATAP, S. V.; HARITHA, R.; SIVUDU, K. S.; RADHIKA, P.; SREEDHAR, B. Gum Acacia as a Facile Reducing, Stabilizing, and templating Agent for Palladium Nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, 121, 1765–1773, 2010.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, 17, 25-39, 2003.

DOAK, J.; GUPTA, R. K.; MANIVANNAN, K.; GHOSH, K.; KAHOL, P. K. Effect of Particle Size Distribution on Absorbance Spectra of Gold Nanoparticles. **Physica E.** 42, 1605 – 1609, 2010.

DU, S.; KENDALL, K.; TOLOUEINIA, P.; MEHRABADI, Y.; GUPTA, G.; NEWTON, J. Aggregation and adhesion of gold nanoparticles in phosphate buffered saline. **Journal of Nanoparticle Research**, 14-758, 2012.

EUTIS, S.; EL-SAYED, M. Why nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Society Review**, 35, 209-217, 2006.

FANG, D.; HUANG, K.; LIU, S.; LI, Z. Electrochemical properties of ordered TiO<sub>2</sub> nanotube loaded with Ag nanoparticles for lithium anode material. **Journal of Alloys and Compounds**, 464, L5 – L9, 2008.

FENT, G. M.; CASTEEL, S. W.; KIM, D. Y.; KANNAN, R.; KATTI, K.; CHANDA, N. Biodistribution of maltose and gum arabic hybrid gold nanoparticles after intravenous injection in juvenile swine. **Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 5, 128–135, 2009.

FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S.; ROCHA, H. A. O.; DA SILVEIRA, R. B.; PALUDO, K. S.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S. S.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Glycosaminoglycan chains from  $\alpha_5\beta_1$  integrin are involved in fibronectin-dependent cell migration. **Biochemistry and Cell Biology**, 87, 677-686, 2009.

GARRATT-REED A. J.; BELL, D.C. Energy dispersive X-ray analysis in the electron microscope. **BIOS Scientific Publisher**. 25, 162, 2003.

GILS, P. S.; RAY, D.; SAHOO, P. K. Designing of silver nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, 46, 237–244, 2010.

GLICKSMAN, M.; SAND, R.E.; WHISTLER, R.L. e BEMILLER, J.N. Industrial Gums, Polysaccharides and their derivatives. **Academic Press**, 198-254, 1973.

GOIA, D. V.; MATIJEVIC, E. Tailoring the particle size of monodisperse colloidal gold. **Colloids and surfaces A**, 146, 139-152, 1999.

GREIN, A; SILVA, B. C.; WENDEL, C. F.; TISCHER, C. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; MOURA, A. B. D.; IACOMONI, M.; GORIN, P. A .J.; SIMAS-TOSIN, F. F.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Strucutural characterization and emulsifying properties of polysaccharides of *Acacia mearnsii* de Wild gum. **Carbohydrate Polymers**, 92, 312-320, 2013.

GRZELCZAK, M.; PÉREZ-JUSTE, J.; MULVANEY, P.; LIZ-MARZÁN, L. M. Shape control in gold nanoparticles synthesis. **Chemical Society Review**, 37, 1783-1791, 2008.

GUAN, H.; YU, J.; CHI, D. Label-free Calorimetric Sensing of Melanine Based on Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles Probes. **Food Control**. 32, 35-41, 2013.  
GUO, S.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Analytica Chemical Acta**. 598, 181 – 192, 2007.

HERMANN, R.; WALTHER, P.; MULLER, M. Immunogold labeling in scanning electron microscopy. **Histochemistry and Cell Biology**, 106, 31-39, 1996.

HUANG, H.; YANG, X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. **Carbohydrate Research**. 339, 2627 – 2631, 2004.

IDRIS, O. H. M., WILLIAMS, P. A., & PHILLIPS, G. O. Characterisation of gum from *Acacia senegal* trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. **Food Hydrocolloids**, 12, 379–388, 1998.

ISLAM, A.M.; PHILLIPS, G.O.; SLJIVO, A.; SNOWDEN, M.J.; WILLIAMS, P.A. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. **Food Hydrocolloids**, 11, 493-505, 1997.

JIANG, J.; OBERDORSTER, G. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, 11, 77-89, 2009.

KANNAN, R.; ZAMBRE, A.; CHANDA, N.; KULKARNI, R.; SHUKLA, R.; KATTI, K.; UPENDRAN, A.; CUTLER, C.; BOOTE, E.; KATTI, V. K. Functionalized radioactive gold nanoparticles in tumor therapy. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 4, 42–51, 2012.

KATTI, K. V. *et al.* Hybrid gold nanoparticles in molecular imaging and radiotherapy. **Czechoslovak Journal of Physics**, 56, 23-56, 2006.

KATTUMURI V, KATTI KK, BHASKARAN S, BOOTE E, CASTEEL S, FENT G. Gum arabic as a phytochemical construct for the stabilization of gold nanoparticles: In vivo pharmacokinetics and x-ray-contrast-imaging studies. **Small Journal**, 333-41, 2007.

KATTUMURI, V. **Gold nanoparticles for biomedical applications: synthesis, characterization, *in vitro* and *in vivo* studies**. Tese (Doutorado em Química). University of Missouri, Columbia, 2006.

KELLY, K. L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L.; SCHATZ, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape and dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, 107, 668-677, 2003.

KIM, T.; LEE, C. H.; JOO, S. W.; LEE, K. Kinetics of gold nanoparticles aggregation: experiments and modeling. **J. Colloid Interface Sci.** 318, 238-243, 2008.

KIM, T.; LEE, K.; GONG, M.; JOO, S. W. Control of gold nanoparticle aggregates by manipulation of interparticle interaction. **Langmuir**. 21, 9524-9528, 2005.

KUCHIBHATLA, S.; KARAKOTI, A. S.; SEAL, S. Colloidal surface by surface modification. **JOM**, 52-56, 2005.

LAMER, V. K.; DINEGAR, R. H. J. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. **Am. Chem. Soc.** 72, 4847– 4854, 1950.

LEE, Y. S. **Self-assembly and nanotechnology: a force balance approach**. 1 ed. New Jersey: John Wiley. 2008.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. **International Reviews in Physical Chemistry**, 19, 409 – 453, 2000.

LIZ-MARZÁN, L. M. Nanometals formations and color. **Materials today**, 2, 26-31, 2004.

MAYE, M. M.; HAN, L.; KARIUKI, N. N.; LY, N. K.; CHAN, W. B.; LUO, J.; ZHONG, C. J. Gold and alloy nanoparticles in solution and thin film assembly: spectrophotometric determination of molar absorptivity. **Analytica Chimica Acta**, 496, 17–27, 2003.

MEDINA-RAMIREZ, I. M.; GARCIA, M. G.; LIU, J. L. Nanostructure characterization of polymer stabilized gold nanoparticles and nanofilms derived from green synthesis. **Journal of Material Science**, 44, 6325–6332, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **Journal of immunological methods**, 65, 55-63, 1983.

MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. **Langmuir**, 12, 788-800, 1996.

NAZIR, S.; HUSSAIN, T.; AYUB, A.; RASHID, U.; MACROBERT, A. J. Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. 10, 19-34, 2014.

NISHI, K. K.; JAYAKRISHNAN, A. Self-gelling primaquine-gum arabic conjugate: an injectable controlled delivery system for primaquine. **Biomacromolecules**, 8, 84-90, 2007.

OFIR, Y.; SAMANTA, B.; ROTELLO, V. M. Polymer and biopolymer mediated self-assembly of gold nanoparticles. **Chemical Society Review**, 37, 1814-1825, 2008.

ORENDORFF, C.J.; GOLE, A.; SAU, T.K.; MURPHY, C.J. "Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers: Sandwich Architecture and Nanoparticle Shape Dependence". **Analytical Chemistry**, 77, 3261-3266, 2005.

OSMAN, M. E., WILLIAMS, P. A., MENZIES, A. R., & PHILLIPS, G. O. Characterization of commercial samples of gum arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41, 71-77, 1993.

PELAZ, B.; JABER, S.; ABERASTURI, D. J.; WULF, V.; AIDA, T.; FUENTE, J. M.; FELDMANN, J.; GAUB, H. E.; JOSEPHSON, L.; KAGAN, C. R.; KOTOV, N. A.; LIZ-MARZAN, L. M.; MATTOUSSI, H.; MULVANEY, P.; MURRAY, C. B.; ROGACH, A. L.; WEISS, P. S.; WILLNER, I.; PARAK, W. J. The state of nanoparticle-based nanoscience and biotechnology: progress, promises, and challenges. **ACS Nano**. 6, 8468–8483, 2012.



PEREIRA, F.C.; ZANONI, M. V. B.; UGO, L.M.P. Características ópticas e morfológicas de nanoestruturas de ouro. **Química Nova**, 7, 1550-1554, 2007.

PRATHNA, T. C.; CHANDRASEKARAN, N.; RAICHUR, A. M.; MUKHERJEE, A. Kinetic evolution studies of silver nanoparticles in a bio-based green synthesis process. **Colloids Surf., A**, 377, 212-216 2011.

QUINA, F. H. **Introduction to surfaces, interfaces, emulsions & foams**. Trabalho apresentado na 2ª Escola de Verão de Colóides, São Paulo, 2014.

RANDALL, R. C.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Fractionation and characterization of gum from Acacia senegal. **Food Hydrocolloids**, 3, 65–75, 1989.

RANDALL, R. C.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. The role of proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. **Food Hydrocolloids**, 2, 131–140, 1988.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Review**, 35, 583-592, 2006.

SABIR, T. S.; YAN, D. ; MILLIGAN, J. R.; ARUNI, A. W.; NICK, K. E.; RAMON, R. H.; HUGHES, J. A.; KURTI, R. S.; PERRY, C. C. Kinetics of gold nanoparticle formation facilitated by triblock copolymers. **J. Phys. Chem. C**, 116, 4431-4441, 2012.

SARDAR, R.; FUNSTON, A. M.; MULVANEY, P.; MURRAY, R. W. Gold nanoparticles: past, present and future. **Langmuir**, 25 (24), 13840-13851, 2009.

SHAW, D. J. **Colloid and surface chemistry**. 4 ed. Burlington: Elsevier Science, 1992.

SHIBATA, H.; OHKUBO, T.; KOHNO, H.; RANGSUNVIGIT, P.; SAKAI, H. Preparation and photocatalytic activity of titania particulate film with mesostructure silica as binder. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 181, 357-362, 2006.

SHIELDS, S. P.; RICHARDS, V. N.; BUHRO W. E. Nucleation control of size and dispersity in aggregative nanoparticle growth. a study of the coarsening kinetics of thiolate-capped gold nanocrystals. **Chem. Mater.** 22, 3212–3225, 2010.

STOKES, R. J.; MACASKILL, A.; LUNDAHL, P.J.; SMITH, W. E.; FAULDS, K.; GRAHAM, D. Quantitative Enhanced Raman Scattering of Labeled DNA from Gold and Silver Nanoparticles. **Small Journal**, 3, 1593-1601, 2008.

ULLAH, M. H.; HOSSAIN, T.; HA, C. S. Kinetic studies on water-soluble gold nanoparticles coordinated to poly(vinylpyrrolidone): isotropic to anisotropic transformation and morphology. **Journal of Material Science**. 46, 6988 – 6997, 2011.

VENTOSA, E.; COLINA, A.; HERAS, A.; RUIZ, V.; GAROZ, J.; LOPEZ-PALACIOS, J. One-pot synthesis of gold/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanocomposite. **Journal of Nanoparticles Research**. 14, 661, 2012.

VIJAYAKUMAR, S.; GANESAN, S. In vitro cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents. **Journal of nanomaterials**, 2012, 1-9, 2012.

VERBEKEN, D., DIERCKX, S., DEWETTINCK. Exudate gums: Occurrence, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63, 10–21, 2003.

WANG, B.; WANG, L. J.; LI, D.; ADHIKARI, B.; SHI, J. Effect of Gum Arabic on Stability of Oil-in-Water Emulsion Stabilized by Flaxseed and Soybean Protein. **Carbohydr. Polym.** 86, 343-351, 2011.

WANG, H. M.; LOGANATHAN, D.; LINHARDT, R. J. Determination of the pK<sub>a</sub> of glucuronic-acid and the carboxy groups of heparin by c-13-nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. **Biochem. J.** 278, 689-695, 1991.

WANG, L.; LIU, C. H.; NEMOTO, Y.; FUKATA, N.; WU, K. C. W.; YAMAUCHI, Y. Rapid synthesis of biocompatible gold nanoflowers with tailored surface textures with the assistance of amino acid molecules. **RSC Adv.** 2, 4606-4311, 2012.

WELLER, M.T. The Application and Interpretation of Powder X-ray Diffraction Data. **Inorganic Materials Chemistry**. 15–25, 1994.

WILLIAMS, P. A., & PHILLIPS, G. O. Gum Arabic. **Handbook of hydrocolloids**. 9, 155-168, 2000.

WU, C. C.; CHEN, D. H. Facile green synthesis of gold nanoparticles with gum arabic as a stabilizing agent and reducing agent. **Gold Bull.** 43, 234-240, 2010.

ZAKARIA, H. M.; SHAH, A.; KONIECZNY, M.; HOFFMANN, J. A.; NIJDAM, J.; REEVES, M. E. Small molecule- and amino acid-induced aggregation of gold nanoparticles. **Langmuir**. 29, 7661-7673, 2013.

ZEILJEMAKER, F.C.J. The gummosis of black wattle: a complex of disease. **Wattle Research institute**, 40-43, 1968.

**ANEXO 1 – APROVEITAMENTO ACADÊMICO**

Relação de disciplinas cursadas e concluídas

Código	Nome da disciplina	Créditos	Conceito
CQ792	Seminários A	2	A
CQ793	Seminários B	2	A
CQ836	Métodos Físicos de Análise Orgânica I	4	B
CQ736	Métodos Físico-Químicos de Caracterização de Macromoléculas e Interfaces	4	C
CQ834	Introdução à Ciência de Polímeros	4	B
CQ820	Eletroquímica Avançada	4	A

## ANEXO 2 – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### Artigos submetidos para publicação:

Exploring the effect of gum arabic as stabilizer of gold nanoparticles in physiological simulated pHs. de Barros, H. R.; Cardoso, M. B.; Vidotti, M.; Riegel-Vidotti, I. C. **Nanotechnology**. Em análise.

### Participação em congressos:

II Simpósio Internacional de Nanobiotecnologia, Curitiba, abril de 2013.  
12º Congresso Brasileiro de Polímeros, Florianópolis, setembro de 2013.

### Trabalhos apresentados em congressos:

de BARROS, H. R.; VIDOTTI, M.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Synthesis of gold biocompatible nanoparticles using gum arabic as stabilizer. **II Simpósio Internacional de Nanobiotecnologia**, 2013, Curitiba.

de BARROS, H. R.; VIDOTTI, M.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Síntese de nanopartículas de ouro utilizando goma arábica como agente estabilizante: acompanhamento por UV-Vis, voltametria e MET. **12º Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2013, Florianópolis.

### Cursos:

SAXS Workbench, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas/SP, outubro de 2013.

2ª Escola de Verão em Colóides e Superfícies, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, janeiro de 2014.